

Aus der Klinik für Augenheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Vergleichende in vitro Analyse von primären und immortalisierten
Keratozyten anhand von Zytotoxizitätstests mit Konservierungsstoffen für
Augentropfen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Lionella Kagan
aus Riga

Gutachter: 1. Prof. Dr. Dr. P. Rieck
2. Prof. Dr. K. Engelmann
3. Prof. Dr. F. E. Kruse

Datum der Promotion: 20.11.2009

Für meine Mutter

Das Auge:

Man hält es kaum für möglich, dass ein so kleiner Raum die Bilder des ganzen Weltalls zu fassen vermag! O großartiges Geschehen! Welcher Verstand könnte diese Naturerscheinung ergründen? Welche Sprache könnte ein solches Wunder erklären? Gewiss keine! Das führt den menschlichen Sinn zur Betrachtung des Göttlichen.

Leonardo Da Vinci (1452-1519)

Nil tam difficile est, quin quaerendo investigari possiet.

Nichts ist so schwierig, dass es nicht durch Nachforschen aufgespürt werden könnte.

Terenz (190 v.Chr.-159 v. Chr.), Heautontimorumenos 675

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	8
1.1 DIE HORNHAUT	8
1.2 AUGENTROPFEN UND IHRE PROBLEME.....	9
1.3 KERATOZYTEN.....	10
1.3.1 Primäre Keratozyten (HCKp).....	10
1.3.2 Immortalisierte Zellen und die Entwicklung von immortalisierten Keratozyten (HCKi)	13
1.4 SUBSTANZEN.....	16
1.4.1 Benzalkoniumchlorid (BAC).....	16
1.4.2 Cetrimid.....	18
1.5 ZYTOTOXIZITÄTSTESTS.....	19
1.5.1 Zelltod.....	19
1.5.2 Vitalitäts- und Apoptosetests.....	20
2. ZIEL DER EXPERIMENTELLEN ARBEIT.....	22
3. MATERIAL UND METHODEN.....	23
3.1 PRIMÄRE HCK (HCKp).....	23
3.1.1 Isolierung primärer HCK.....	23
3.1.2 Zellkultivierung.....	24
3.1.3 Keratozytenmedium.....	24
3.1.4 Passage der primären Zellkultur.....	26
3.2 IMMORTALISIERTE HCK (HCKi).....	27
3.2.1 Isolierung/ Herstellung immortalisierter HCK.....	27
3.2.2 Kultivierung immortalisierter HCK.....	27
3.2.3 Passage immortalisierter HCK.....	28
3.3 WEITERE MEDIEN.....	28
3.4 EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLKULTUREN.....	29
3.5 AUSWERTUNGSMETHODEN.....	30
3.5.1 Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer.....	30
3.5.2 Proliferationsmessung mittels Cell Analysing System (CASY 1).....	30
3.5.2.1 Messprinzip des Zellcounters.....	30
3.5.2.2 Messprotokoll.....	31

3.5.2.3 Auswertung der Messungen.....	31
3.5.2.4 Berechnung der Verdopplungszeit.....	32
3.5.3 TUNEL-ASSAY.....	33
3.5.3.1 Prinzip des TUNEL-Assays.....	33
3.5.3.2 Färbeprotokoll.....	33
3.5.4 Annexin-V-Fluorescein/ Propidiumiodid-Assay.....	34
3.5.4.1 Prinzip der Fluoreszenzfärbung mittels Annexin-V-Fluorescein und Propidiumiodid.....	34
3.5.4.2 Färbeprotokoll für das Annexin-V-Fluorescein/Propidiumiodid- Assays.....	35
3.6 VERSUCHSAUFBAU.....	36
3.6.1 Proliferationsversuche mit Benzalkoniumchlorid und Cetrimid.....	36
3.6.2 Durchführung des TUNEL- Assays.....	37
3.6.3 Durchführung des Annexin-V-Fluorescein/ Propidiumiodid- Assays.....	38
3.7 STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	38
4. ERGEBNISSE.....	39
4.1 AUSWERTUNG DES PROLIFERATIONSASSAYS FÜR DEN WIRKSTOFF BENZALKONIUMCHLORID (BAC).....	39
4.1.1 Morphologische Auswertung der mit BAC behandelten Zellkulturen.....	39
4.1.2 Auswertung der Verdopplungszeit.....	42
4.1.2.1 Auswertung der Verdopplungszeit bei mit BAC behandelten HCKp.....	42
4.1.2.2 Auswertung der Verdopplungszeit bei mit BAC behandelten HCKi.....	43
4.1.3 Auswertung der Proliferationsergebnisse der mit BAC behandelten Zellkulturen.....	44
4.1.3.1 Auswertung der Proliferationsergebnisse bei primären Keratozyten.....	44
4.1.3.2 Auswertung der Proliferationsergebnisse bei immortalisierten Keratozyten.....	45
4.1.4 Auswertung des Vitalitätsanteils der mit BAC behandelten Zellkulturen.....	46
4.1.4.1 Auswertung des Vitalitätsanteils der mit BAC behandelten HCKp.....	46
4.1.4.2 Auswertung des Vitalitätsanteils der mit BAC behandelten HCKi.....	47
4.1.5 Vergleich der Ergebnisse zwischen primären und immortalisierten Keratozyten.....	47
4.1.5.1 Vergleich der mit BAC behandelten HCKp und HCKi.....	48
4.1.5.2 Vergleich der Vitalität zwischen mit BAC behandelten HCKp und HCKi.....	50
4.2 ERGEBNISSE DES TUNEL-ASSAYS (BAC).....	51

4.3	ERGEBNISSE DES ANNEXIN-V-FLUORESCHEIN/ PROPIDIUMIODID-ASSAYS (BAC).....	53
4.4	AUSWERTUNG DES PROLIFERATIONSASSAYS FÜR DEN WIRKSTOFF CETRIMID.....	55
4.4.1	Morphologische Auswertung der mit Cetrimid behandelten Zellkulturen.....	55
4.4.2	Auswertung der Verdopplungszeit.....	58
4.4.2.1	Auswertung der Verdopplungszeit bei mit Cetrimid behandelten HCKp.....	58
4.4.2.2	Auswertung der Verdopplungszeit bei mit Cetrimid behandelten HCKi.....	59
4.4.3	Auswertung der Proliferationsergebnisse der mit Cetrimid behandelten Zellkulturen....	59
4.4.3.1	Auswertung der Cetrimid-Proliferationsergebnisse bei HCKp.....	59
4.4.3.2	Auswertung der Cetrimid-Proliferationsergebnisse bei HCKi.....	60
4.4.4	Auswertung des Vitalitätsanteils der mit Cetrimid behandelten Zellkulturen.....	61
4.4.4.1	Auswertung des Vitalitätsanteils der mit Cetrimid behandelten HCKp.....	61
4.4.4.2	Auswertung des Vitalitätsanteils der mit Cetrimid behandelten HCKi.....	62
4.4.5	Vergleich der Ergebnisse zwischen primären und immortalisierten Keratozyten.....	63
4.4.5.1	Vergleich der mit Cetrimid behandelten HCKp und HCKi.....	63
4.4.5.2	Vergleich der Vitalität zwischen mit Cetrimid behandelten HCKp und HCKi.....	65
4.5	ERGEBNISSE DES TUNEL-ASSAYS (CETRIMID).....	66
4.6	ERGEBNISSE DES ANNEXIN-V-FLUORESCHEIN/ PROPIDIUMIODID-ASSAYS (Cetrimid).....	68
5.	DISKUSSION.....	70
5.1	HCKp VERSUS HCKi – SO VERSCHIEDEN UND DOCH GLEICH?.....	70
5.1.1	Morphologie.....	70
5.1.1.1	Beeinflussende Faktoren.....	71
5.1.2	Proliferation.....	72
5.1.3	Verdopplungszeit.....	72
5.2	DIE WIRKUNG VON QUARTÄREN AMMONIUMVERBINDUNGEN AUF KERATOZYTEN.....	73
5.2.1	Die Wirkung von BAC auf HCKp und HCKi im Vergleich.....	73
5.2.2	Die Wirkung von Cetrimid auf HCKp und HCKi im Vergleich.....	75
5.3	DER DURCH QUARTÄRE AMMONIUMVERBINDUNGEN VERMITTELTE ZELLTOD.....	77

5.3.1 Apoptose versus Nekrose.....	77
5.3.2 Doch keine Apoptosen?.....	78
5.4 BAC VERSUS CETRIMID.....	80
5.5 HCKi – EIN GUTER ERSATZ FÜR PRIMÄRE KERATOZYTEN?.....	81
5.6 HCKi UND DER AUFBAU EINES HORNHAUT-KONSTRUKTES.....	82
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	83
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	85
8. VORABVERÖFFENTLICHUNGEN.....	95
9. DANKSAGUNG.....	96
10. LEBENSLAUF.....	97
11. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	99

1. EINLEITUNG

1.1 Die Hornhaut

Die durchschnittlich 11,5 mm große transparente Hornhaut des Auges ist einer der wichtigsten Bestandteile des optischen Systems und stellt mit ihren 43 dpt die größte Brechkraft des Auges dar. Aufgebaut wird die Cornea aus insgesamt fünf Schichten, wobei das Epithel aus dem Ektoderm, die restlichen Hornhautschichten jedoch aus dem Mesenchym hervorgehen. An der Oberfläche des Auges liegt ein unverhorntes mehrschichtiges Plattenepithel, das eine gute Regenerationsfähigkeit bei Verletzungen besitzt. Man kann das aus etwa 5-7 Zellschichten bestehende Epithel in Basal-, Intermediär- bzw. Flügel- und Superficialzellen unterscheiden. Die Epithelzellen sind untereinander durch Desmosomen verbunden und vor allem die Superficialzellen bilden Zonulae occludentes, die hierdurch den Interzellulärspalt verschließen und eine Diffusionsbarriere bilden. Die Basalzellen sitzen auf einer Basalmembran, die mit der Bowmann'schen Membran (auch Lamina limitans anterior genannt) verankert ist. Diese besteht aus kollagenem Bindegewebe, das nicht regenerationsfähig ist und daher bei einer Verletzung mit einer Hornhautnarbe abheilt. Die Bowmann'sche Membran geht kontinuierlich in das Stroma über, das mit etwa 450-500 µm ca. 90% der Hornhautdicke ausmacht und größtenteils aus extrazellulärem Material aufgebaut ist. Es besteht aus etwa 200-250 Lamellenschichten, in denen parallel ausgerichtete Kollagenfibrillen^{1,2,3,4} in einem hexagonalem Gitter liegen.⁵ Die vorherrschenden Collagene, aus denen die Fibrillen und die Lamellen bestehen, sind die Collagentypen I und V.^{6,7} Keratozyten bzw. aktivierte Fibroblasten (Abb.1) liegen in einer proteoglykanreichen Grundsubstanz vor, die aus Chondroitinsulfat und Keratansulfat besteht und die Fibrillen auseinanderhält. An das Stroma schließt sich die Descemet-Membran (auch Lamina limitans posterior) an, die ebenfalls aus einem Kollagenfibrillengitterwerk besteht und einer Basalmembran entspricht. Ihr angelagert ist das einschichtige Endothel, das aus hexagonalen Zellen besteht. Diese Zellschicht ist nicht regenerationsfähig und gleicht einen Zellverlust nur über Vergrößerung der verbleibenden Zellen aus. Das Endothel ist vor allem für die Dehydratation des Stromas durch eine aktive Ionenpumpe und durch selektive Diffusion verantwortlich.

Insgesamt ist die Hornhaut ein sehr bradytrophes und gefäßfreies Gewebe, das hierdurch nur schlecht regenerationsfähig, jedoch immunologisch gerade dadurch für Transplantationszwecke bevorzugt ist.^{1,2,3,4,7} Innerviert wird die Cornea vom N.Trigeminus. Die Nährstoffversorgung der Hornhaut wird über Diffusion aus dem Randschlingennetz der Bindehautgefäße und durch Stoff-

und Ionenaustausch aus dem Kammerwasser und dem Tränenfilm bewerkstelligt. Der Tränenfilm enthält das bakterizide Ferment Lysozym, das das Auge vor Infektionen schützt.^{1,2,3,4}

1.2 Augentropfen und ihre Probleme

Viele okuläre Erkrankungen machen eine medikamentöse Therapie mit Augentropfen unumgänglich. Zu diesen Erkrankungen gehören das Glaukom^{8,9}, Uveitiden¹⁰, Keratokonjunktivitis sicca^{11,12}, aber auch die immer populärer werdenden refraktiven Operationen wie LASIK oder PRK, die mit einer nachfolgenden Trockenheit des Auges einhergehen.^{13,14,15} Das „Trockene Auge“ zum Beispiel, an dem ca. 10 Mio. Deutsche leiden¹¹, entsteht entweder durch eine mangelnde Tränensekretion (hypovolämisch – mit Assoziation oder auch ohne Sjögren-Syndrom) oder durch eine verstärkte Verdunstung der Tränen (hyperevaporativ - z.B. im Zusammenhang mit häufigem Kontaktlinsentragen oder langer Bildschirmarbeit). Dies führt zu Störungen des Tränenfilms bzw. seiner Stabilität und folgend zu Epitheldefekten, wodurch es zu einer gesteigerten Permeabilität der Hornhaut und hiermit zu einer Störung der Barrierefunktion kommt.^{11,12} Auch eine verminderte Oberflächensensibilität¹³ ist bei diesen Patienten, aber auch nach refraktiver Korrektur durch Durchtrennung von Nervenfasern und nachfolgender verminderter Tränenproduktion, anzutreffen.^{14,15,16}

In den meisten Augentropfen sind Konservierungsmittel enthalten, die zum einen antiseptisch, insbesondere gegen Bakterien und Pilze wirken, zum anderen die Haltbarkeit der Tropfen steigern sollen. Meistens sind diese Konservierungsmittel allerdings in hohen Dosen toxisch für das Hornhaut-Epithel, haben einen negativen Einfluss auf die Tränenzusammensetzung und können Allergien hervorrufen. Eines der häufigsten in Augentropfen verwendeten Konservierungsmittel ist Benzalkoniumchlorid (BAC). Neben seiner toxischen Wirkung auf Hornhautzellen, erhöht es zusätzlich die Hornhautpermeabilität. Hierdurch können die Medikamentenwirkstoffe stärker ins Auge penetrieren und dort Wechsel- und Nebenwirkungen hervorrufen, andererseits können auch tieferliegende Hornhautschichten durch diese Permeabilitätssteigerung direkt geschädigt werden^{17,18,19} (siehe Kap. 1.4.1). Cetrimid, das auch häufig Verwendung findet, ist in höheren Dosen ebenfalls toxisch für das Hornhautepithel^{20,21} (siehe Kap.1.4.2). Polyquad (Polyquaternium-1 bzw. Polidroniumchlorid), ein neueres Konservierungsmittel, gehört wie auch BAC und Cetrimid zu den quartären Ammoniumverbindungen. Es scheint allerdings weniger toxisch zu sein als Benzalkoniumchlorid und ist hierdurch auch für längere Behandlungen anwendbar.^{22,23,24,25} Thiomersal bzw. Thimerosal, eine Quecksilberverbindung, wird aufgrund seiner seit langem bekannten schwer toxischen Wirkung

und schwerer allergischer Reaktionen, wie z.B. einer folliculären allergischen Kontakt-Konjunktivitis mit teilweise schwerer Lid-Dermatitis, nur noch selten verwendet.^{26,27,28}

Insgesamt lautet die momentane Empfehlung, bei mehr als vier Tropfanwendungen pro Tag eher unkonservierte Tropfen zu verwenden. Viele Medikamente und Tränenersatzmittel sind in Einzeldosisbehältern erhältlich, wodurch auch ohne Konservierungsmittel ein guter Keimschutz gewährleistet werden kann.²⁹

1.3 Keratozyten

1.3.1 Primäre Keratozyten (HCKp)

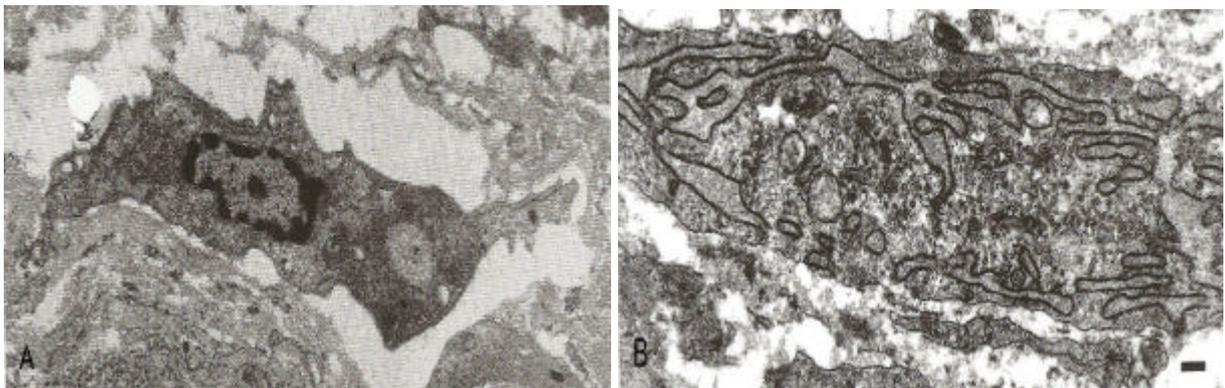


Abbildung 1: A: Keratozyt im Ruhezustand; B: aktivierter Kaninchen-Keratozyt (stromaler Fibroblast) mit durch Aktivierung der Kollagen-Syntheseleistung elektronendichtem, prominentem endoplasmatischem Retikulum. Balken = 1µm. (B: mit Genehmigung aus Rieck et al.³⁰)

Primäre Keratozyten liegen in nur sehr geringer Anzahl in einer proteoglykanreichen Grundsubstanz der extrazellulären Matrix zwischen aus Collagen I und V bestehenden Lamellen aus Kollagenfibrillen vor. Diese flachen, dendritischen Zellen sind mesenchymalen Ursprungs und befinden sich in der unverletzten Hornhaut in der G₀-Phase, also in einem Ruhezustand, wobei sie durch zelluläre Ausläufer mit einander verbunden sind. Durch Gap Junctions bilden sie ein Synzytium.^{6,7} Ihre Funktion ist es, die extrazelluläre Matrix und die Kollagenfibrillen zu synthetisieren. Keratansulfatproteoglykane, zu denen die Moleküle Lumican, Keratocan und Mimecan zählen, stabilisieren die Kollagenfibrillenabstände und stellen mit 60% den größten Anteil an Proteoglykanen im Stroma.³⁰ Decorin, ein Chondroitin-/Dermatansulfatproteoglykan, ein weniger hydrophiles Proteoglykan, ist für longitudinale Verbindungen der Kollagenfibrillen verantwortlich und kommt vor allem im anterioren Teil des Stromas vor. Dies erklärt, warum bei einer Schwellung der Hornhaut ebendiese vom posterioren zum anterioren Abschnitt abnimmt.³¹ Die Proteoglykane sind entscheidend für die Stabilität und Transparenz der Hornhaut, die auch unter starker Beanspruchung und nach Schwellung noch gegeben ist.³²

Eine Theorie zur Transparenz der Cornea entwickelte Maurice, wobei er annahm, dass die Fibrillen durch jeweils sechs Proteoglykane in regelmäßigen Abständen von etwa 60° mit ihren nächsten Nachbarn verbunden sind.^{5,33} Durch eine parallele Anordnung der Lamellen und der gleichmäßigen Verteilung der Kollagenfibrillen mit Bildung eines perfekten hexagonalen Kristallgitters sollte so die Transparenz der Cornea durch konstruktive bzw. destruktive Interferenzen gesichert werden, wodurch sich die geringe Streuung des Lichts von <1% ergab. Müller et al. zeigten, dass anscheinend die Proteoglykane länger sind als der Fibrillenabstand, so dass er die neue Theorie entwickelte, dass ebenfalls sechs Proteoglykane nicht mit der nächsten Nachbarfibrille verbunden sind, sondern mit der nächst-nächsten, wobei sie dabei ein ringartiges Netzwerk bilden, das die Kollagenfibrillen umschließt.³⁴

Auch die Keratozyten an sich spielen eine entscheidende Rolle bei der Transparenzerhaltung der Hornhaut. Es wurde festgestellt, dass die Keratozyten in einer geschädigten Hornhaut die Hauptquelle für eine erhöhte Rückstreuung des Lichts und damit für eine Trübung verantwortlich sind.^{35,36} Um dies zu verstehen, muss man die Rolle der Keratozyten bei der Wundheilung einer verletzten Hornhaut betrachten.

Bei Verletzung des Epithels kommt es zu einer Freisetzung von insbesondere IL-1³⁷ und Fas-Ligand³⁸ durch das Epithel. Diese gelangen in das Stroma, wo sie an Keratozyten binden, die IL-1 und Fas-Rezeptoren aufweisen, und setzen hierdurch eine ganze Reaktionsreihe in Gang. Eines der ersten Veränderungen, die im Stroma induziert werden, ist das Phänomen der „disappearing keratocytes“. Durch Apoptose gehen Keratozyten im vorderen Stromagebiet kurz nach Verletzung des Epithels unter.^{6,30,39,40} Durch stärkere Tränensekretion wird die Wunde gespült, wobei aber durch die gestörte Barrierefunktion der Hornhaut die in den Tränen enthaltenen Faktoren die Keratozytenapoptose noch zusätzlich triggern können.^{40,41,42,43,44} Auf der anderen Seite wirkt IL-1 stimulierend auf die Bildung von chemotaktisch wirkenden Zytokinen durch Keratozyten und führt einige Stunden nach Verletzung zu einer Aktivierung der verbliebenen ruhenden Keratozyten, wodurch diese beginnen zu proliferieren und zur Wunde hin zu migrieren.^{6,30,39,40} Die aktivierten Keratozyten sind größer und weisen einen fibroblastischen spindelförmigen Phänotyp auf.⁷ Sie beginnen MMP (Matrix Metalloproteinasen) zu bilden, die notwendig für den Wiederaufbau des Stromas sind. Die Matrix Metalloproteinasen führen zu einem Abbau von sowohl kollagenen wie auch zellulären Bestandteilen und hiernach zu einem Wiederaufbau der extrazellulären Matrix.^{6,30,39,40,45} Es wird vermehrt Collagen III und fetales Collagen synthetisiert, die nur im fibrotischen Gewebe (in Zusammenhang mit einer a-SMA Expression (siehe unten)) und nicht in einer gesunden Cornea vorkommen. Außerdem

kommt es zu einer verminderten Keratansulfatproteoglykansynthese und einer verstärkten Synthese von Dermatan-/ Chondroitinsulfatproteoglykanen in den aktivierten Fibroblasten. Dies führt durch eine Erhöhung der Wasserretentionskapazität zu einem stromalen Ödem, das den Substanzverlust ausgleicht.^{7,30,46}

Außerdem bewirkt das IL-1 in den aktivierten Keratozyten die Fähigkeit zur eigenständigen IL-1 Synthese, d.h. zur Bildung einer sogenannten autokrinen Schleife, die in einer intakten Cornea nicht vorhanden ist.^{6,30,42,47} Wenn die Basalmembran mitbeschädigt ist, wird zusätzlich TGFβ2 und PDGF (platelet-derived-growth-factor) von den Epithelzellen freigesetzt. Diese führen zu einer Differenzierung der aktivierten Keratozyten bzw. Fibroblasten zu einem myofibroblastischen Phänotyp, der durch die Expression von α-SMA (α-smooth-muscle-actin) und eine stärkere Lichtstreuung gekennzeichnet ist (siehe Abb.1B). Dies hat eine gesteigerte Kontraktilität der Myofibroblasten und somit eine starke Kontraktion der extrazellulären Matrix zur Folge, wodurch der Wundspalt verkleinert wird.^{6,7,30,39,40,46} PDGF führt außerdem durch eine Epithel-Stroma-Interaktion zu einer Steigerung der Fibroblastenproliferation und einer Chemotaxis. Auf der anderen Seite produzieren unter der Regulierung von IL-1 Keratozyten und Myofibroblasten HGF (hepatocyte growth factor) und KGF (keratocyte growth factor), die zu einer Steigerung der Epithel-Proliferation, -Motilität und -Differenzierung führen.^{30,40,42} Der Wiederaufbau der Epithelschicht erfolgt erst einschichtig. Sobald die Basalmembran wiederhergestellt ist, hört die Freisetzung von TGFβ2 auf und die Myofibroblasten verschwinden. Es scheint, dass die myofibroblastische Transformation nicht endgültig, sondern reversibel ist, d.h. dass die Zellen in einen fibroblastischen Phänotyp zurückkehren können.^{7,40,48} Letztendlich ist dies aber bzw. die Art der Rückbildung nicht vollständig geklärt, da auch Vermutungen bestehen, dass die Myofibroblasten durch Apoptose einfach untergehen.⁴⁰ Aktivierte Keratozyten bilden aber auch weiterhin autokrin IL-1 und sind beim Remodeling des Stromas durch MMP Expression maßgeblich beteiligt. Keratozyten scheinen zusätzlich Phagozytose-Eigenschaften zu besitzen.^{49,50} Es bleibt die Frage, warum Myofibroblasten das Licht stärker reflektieren und somit eine verstärkte Lichtstreuung verursachen. Jester et al. fanden heraus, dass Transketolase (TKT) und Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH1) refraktive Index-Inhomogenitäten im Keratozyten-Zytoplasma ausgleichen.^{35,51} Bei Verletzung der Hornhaut kommt es zu einer Runterregulierung dieser wasserlöslichen Proteine in Zusammenhang mit der myofibroblastischen Transformation der Keratozyten und somit zu einer stärkeren Lichtstreuung. Auch nach einer Heilung und einem Remodeling der Hornhaut bleibt

die verstärkte Streuung eine längere Zeit bestehen, da die Hochregulierung dieser Proteine schwierig zu sein scheint und Zeit braucht.

Bei der Kultivierung von Keratozyten *in vitro* wurde von mehreren Arbeitsgruppen festgestellt, dass es durch Zugabe von Fetalem Calf Serum (FCS), insbesondere in hohen Konzentrationen wie 10%, zum Medium zu einer fibroblastischen Umwandlung bzw. Aktivierung kommt.^{6,7,50,52,53} Dies ist darauf zurückzuführen, dass im Serum verschiedene Wachstumsfaktoren, Salze, Proteine, Lipide und Hormone vorkommen, die in der jeweiligen Charge differieren können.⁵⁴ Aber auch einfach durch Subkultivierung und Splittung der Kultur oder durch Kultivierung bei einer sehr geringen Zelldichte⁵⁵ kann eine Aktivierung der Keratozyten, ähnlich einem Wundreiz in der Cornea, entstehen.⁷ Durch Zugabe von TGF β zum Medium resultiert eine myofibroblastische Differenzierung der Zellen mit Expression von α -SMA.^{52,56} Insulin dagegen scheint einen protektiven Einfluss auf den Keratozyten-Phänotyp zu haben.⁵⁴

1.3.2 Immortalisierte Zellen und die Entwicklung von immortalisierten Keratozyten (HCKi)

Primäre Cornea- Zellen lassen sich nur schwer anzüchten, sind von Faktoren wie Alter des Spenders, aber auch Lagerungsdauer abhängig und erreichen bereits nach wenigen Passagen ihre Seneszenz. Die hierdurch insbesondere in großangelegten Studien schwierige Sicherstellung einer guten Vergleichbarkeit der Ergebnisse führte im Zuge der zunehmenden Forderung nach standardisierten Versuchen in der Forschung zur Entwicklung von neuen immortalisierten Zellreihen. Diese Zellreihen bieten zum einen den Vorteil, dass sie leichter zu besorgen, aber auch zu versorgen sind als aus Spenderhornhäuten isolierte primäre Zellen, zum anderen bieten sie eine gute Vergleichbarkeit und stellen auch einen Ersatz für Tierversuche wie den Draize-Test⁵⁷ dar.

In den meisten Fällen werden die Zellen durch das Simian Virus SV40, das zur Gruppe der Papovaviren gehört, durch Infektion oder Transfektion immortalisiert. Hierbei ist entscheidend, dass auch Zellen mit verlängerter Lebensspanne irgendwann absterben. Erst Kolonien, die diese Krisis überstehen und das Gen des großen T-Antigens dauerhaft in ihr Zellgenom integrieren, können als immortalisiert bezeichnet werden.⁵⁸ Verschiedene Arbeitsgruppen versuchten zuerst Epithel- und Endothelzellen von Kaninchen und Rindern zu immortalisieren bzw. zumindest eine Verlängerung der Lebensdauer der Zellen in Kultur zu erreichen. Hierfür wurden die Zellen mit einem rekombinanten Adenovirus bzw. seinem Vektor, der das große SV40 T-Antigen der frühen Genregion enthält, infiziert.^{59,60} Feldman et al. benutzten hierfür das Ad5-SVR4 Virus,

das die Zellen zwar infizieren, sich selber aber nicht replizieren kann. Auch Araki et al. erreichten durch Infektion mit einem SV40-Adenovirus-Vektor und hiernach dreimaligem Klonen ein Ergebnis von über 100 Passagen. Als nächstes wurden humane Epithel- und Endothel-Zellreihen mit verlängerter Lebensspanne von Kahn et al. und Wilson et al. durch Transfektion etabliert. Mit dem RSV-T Plasmid (pRSV-T), einem SV40 Ori-Konstrukt, das die frühe SV40 Gen-Region enthält, konnten Kahn et al. eine Verlängerung der möglichen Epithel-Passagen von 5 auf 25 erreichen.⁶¹ Wilson et al. benutzten zur Transfektion hingegen das Hybrid-Plasmid pSV₃-Neo, das das große SV40 T-Antigen kodiert und ein Resistenzgen (Neo) gegen Neomycin-Kanamycin aufweist. Außerdem erreichten sie den Einbau des Vektors bzw. der DNA in die Endothelzellen durch Elektroporation, also durch eine Permeabilisierung der Zellmembran. Durch die so vorhandene Resistenz von immortalisierten Endothelzellen gegen das Antibiotikum G418 konnten die transfizierten Zellen selektiert werden. Diese Selektion ist aber nur bedingt notwendig, da die primären Zellen ohne das große T-Antigen nach kurzer Zeit untergehen. Es wurde eine Pasageanzahl von etwa 38 erreicht.⁶²

1995 schafften es Araki-Sasaki et al. endlich eine immortalisierte Epithelzelllinie durch Infektion der Zellen mit einem rekombinanten SV40-Adenovirus-Vektor und dadurch mehr als 100 möglichen Passagen zu etablieren, die im Gegensatz zu Kahn et al. keine freien Viruspartikel mehr enthielt bzw. produzierte. Außerdem wiesen alle Zellen nach erfolgreicher Immortalisierung das große T-Antigen in der Fluoreszenzfärbung auf und exprimierten das corneaspezifische 64-D-Keratin.⁶³ Bednarz et al. etablierten dann im Jahr 2000 humane immortalisierte Endothelzellen durch Transfektion der Zellen durch das Plasmid pRNS-1, das die frühe SV40 Gen-Region enthält (kodiert sowohl das große T- als auch das kleine t-Antigen), und nachfolgender Elektroporation.⁶⁴

Insgesamt gibt es über die Immortalisierung von Keratozyten bis jetzt nur sehr wenige Studien. Barry-Lane et al. entwickelten eine Kaninchen-Keratozyten-Zelllinie mit verlängerter Lebensspanne, um das Differenzierungsverhalten und die damit verbundene Expression von α -SMA (α -smooth-muscle-actin) als Zeichen der myofibroblastischen Transformation zu erforschen. Die Transfektion der Zellen erfolgte mit dem pSV-3Neo Hybrid-Plasmid (siehe oben). Es konnte gezeigt werden, dass TGF_{B1} eine Aktivierung der Keratozyten hervorrief, die unter serumfreien Verhältnissen gezüchtet wurden. Zwei immortalisierte Zelllinien wurden so etabliert, wobei die eine Zellreihe eine keratozytenähnliche Morphologie bei nicht vorhandener α -SMA-Expression aufwies und eine Myofibroblasten-Zellreihe, die hingegen α -SM Aktin exprimierte.⁶⁵ Auch Jester et al. interessierten sich für die Rolle von TGF_{B1} bei der

Differenzierung von Keratozyten. Untersucht wurden Fibroblasten, die mit einem MPSV-hTERT retroviralen Vektor infiziert wurden. TGF β ₁ führte durch Initiierung einer Phosphorylierungskaskade und des hierdurch aktivierten Smad 2 bei dieser Zellreihe ebenfalls zu einer starken Erhöhung von α -SMA, wobei anscheinend jedoch noch andere Faktoren wie das Integrin-Signal oder der Wachstumsfaktor PDGF bei der Differenzierungskaskade eine wichtige Rolle zu spielen scheinen.⁶⁶ Eine Etablierung von immortalisierten Keratozyten gelang Zorn-Kruppa et al. durch eine Transfektion der Zellen mit einem pSV40-dN-Plasmid, das die frühe SV40-Region enthält. Diese Arbeitsgruppe war die erste, die das Zytotoxizitätsverhalten von primären und immortalisierten Keratozyten unter ähnlichen Verhältnissen erforschte. Insbesondere war es ihr Ziel eine immortalisierte Keratozytenlinie für den Aufbau einer künstlichen Hornhaut im drei-Schichten-Modell zu etablieren.^{67,68} Die Entwicklung einer künstlichen Hornhaut⁶⁹ ist erst durch die Luft-Medium-Grenz-Methode (air-liquid interface method), die zur Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels führt, realistisch möglich geworden. Hierbei wachsen die Zellen in einem meist aus Collagen I-bestehendem Kollagengel bei einem konstant hohen Mediumspiegel. Durch Aufbringen der nächsthöheren Zell-Kollagenschicht und somit durch eine Kokultivierung der einzelnen Zellreihen wird die Hornhaut langsam aufgebaut. Sobald die Epithelschicht konfluent ist, wird das ganze Konstrukt an die Luftgrenze angehoben, was dann zu der beschriebenen Stratifikation der Epithelzellen führt.⁷⁰ Neben der Entwicklung von Zweischicht-Modellen⁷¹ konnte parallel hierzu die Arbeitsgruppe von Minami et al. erstmals das von ihnen entwickelte Air-Liquid Interface Modell an bovinen Zellen etablieren, wobei sie auch die ersten waren, die ein vollständiges dreischichtiges Cornea-Konstrukt vorstellen konnten.⁷⁰ Einen Durchbruch in der Entwicklung einer künstlichen Hornhaut gelang der Arbeitsgruppe um Griffith et al. durch einen dreischichtigen Aufbau der Cornea-Schichten erstmals aus immortalisierten humanen Hornhaut-Zellen. Durch Einbringen von Fibrin, konnte außerdem eine die Angiogenesis fördernde Matrix zum Aufbau einer Pseudo-Sklera entwickelt werden.⁷² Interessant sind auch Studien, in denen das Permeabilitätsverhalten von künstlichen Hornhäuten mit den von Schweinen verglichen wurden. Hierbei scheinen Hornhaut-Konstrukte aus Schweine-Zellen eine höhere Permeabilität aufzuweisen als humane Konstrukte aus immortalisierten Epithel- und Endothelzellen. Insgesamt haben aber auch die humanen Konstrukte eine, wenn auch nur gering, höhere Permeabilität als Schweine-Hornhäute.^{73,74} Das Kollagengel, in das die Zellen eingebettet sind, hat den Nachteil einer Gewebe-Schrumpfung, daher wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen neue Möglichkeiten zum Aufbau eines Konstruktes wie z.B. das Verwenden eines Fibrin-Agarose Gels⁷⁵ entwickelt. Nachteil hierbei ist

allerdings eine nur bedingt vergleichbare Konsistenz und Transparenz der Cornea. Ganz neue Wege beschreitet das Fraunhofer-Institut mit ihrem „Artificial Cornea Project“ durch Polymerforschung. Basis dieser neu entwickelten Keratoprothese ist ein hydrophobes Polymer auf dem eine Ablagerung bzw. ein Wachsen von Zellen unmöglich ist. Durch eine Rand-Beschichtung mit einem Fibronectin-ähnlichen Protein soll ein gutes Einwachsen und Anpassen der Keratoprothese erreicht werden. Die vordere Schicht ist hingegen hydrophil, um ein gutes Haften des Tränenfilms und ein angenehmes Gleiten des Lids über die Prothese sicherzustellen. Erste Versuche an Kaninchen sind bereits in Durchführung und scheinen vielversprechende Ergebnisse zu bringen.⁷⁶

1.4 Substanzen

1.4.1 Benzalkoniumchlorid (BAC)

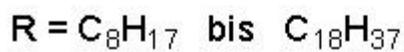
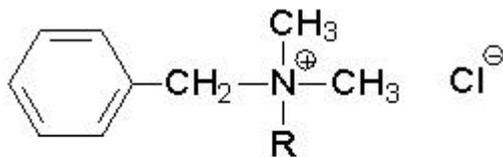


Abbildung 2: Strukturformel von Benzalkoniumchlorid

Benzalkoniumchlorid (BAC) stellt eine quartäre Ammoniumverbindung mit grenzflächenaktiver Wirkung dar und gehört somit zu den Invertseifen. Als kationische Tensid besitzt es einen hydrophoben und einen hydrophilen Molekülteil. BAC ist eigentlich ein Gemisch aus Alkylbenzoldimethylammoniumchloriden, dessen Eigenschaften hauptsächlich auf der Länge des N-Alkylrestes, der aus aliphatischen Kohlenwasserstoffketten von C8 bis C18 besteht, basieren. Die in Präparaten am häufigsten verwendeten Kettenlängen sind C12 und C14²⁰ und ggf. C16⁷⁷, wobei in den meisten Fällen das genaue Mischungsverhältnis nicht klar bzw. nicht bezeichnet ist. Als oberflächen- und grenzflächenaktive Substanz hat BAC antibakterielle und auch antiseptische Eigenschaften, so dass es häufig in Haut-, aber auch Flächendesinfektionsmitteln oder in geringeren Konzentrationen als Konservierungsmittel für Augen- und Nasentropfen verwendet wird. Es stellt das am häufigsten verwendete Konservierungsmittel in Augentropfen dar. Meist werden Konzentrationen von 0,1mg/ml verwendet, die Spannbreite reicht jedoch von 0,025mg/ml bis zu etwa 0,5mg/ml.⁷⁸ BAC reichert sich in der bakteriellen Zellmembran an und zerstört sie hierdurch^{79,80}, außerdem entstehen Wechselwirkungen mit

sogenannten G-Proteinen, den membranständigen Guaninnucleotidtriphosphat-bindenden Proteinen.⁸¹ Die C12 Homologe scheinen am wirksamsten gegen Pilze und Hefen zu wirken, die C14 Homologe gegen gram-positive Bakterien und die C16 Homologe gegen gram-negative Bakterien. Die Wirkung gegen Viren ist dagegen minimal.⁷⁷ Auch kann BAC nur wenig gegen den resistenten Keim *Pseudomonas aeruginosa* ausrichten.

Durch Verbreiterung bzw. Auflösung der interzellulären Verbindungen des Epithels kommt es zu einer Steigerung der Permeabilität. Hierdurch kann BAC bzw. das mit ihm konservierte Medikament stärker in die tieferen Cornea-Schichten penetrieren und dort zum einen zu einer nicht vorgesehenen Exponierung von Stroma und Endothel gegenüber sehr hohen Konzentrationen von BAC, zum anderen zu einer Wirkverstärkung des Medikaments und ggf. zu Wechselwirkungen mehrerer Wirkstoffe führen.^{82,17,18,19}

Toxische Wirkungen auf konjunktivale und corneale Zellen sind seit langem bekannt, wobei alle Schichten hiervon betroffen sind. Diese toxische Wirkung ist dosis- und zeitabhängig, d.h. selbst eine sehr geringe BAC-Konzentration kann bei langer Einwirkzeit oder durch wiederholtes Tropfen schwere Schäden hervorrufen^{83,19,21,22} und eine nachfolgende Heilung verlangsamen.¹⁷ So kann beispielsweise die Verwendung von mit BAC konserviertem viskoelastischem Material bei Katarakt-Operationen zu einer Schädigung des Endothels mit folgender Keratopathie führen.^{84,85} Normalerweise werden die Augentropfen und somit das enthaltene BAC vom Tränenfilm verdünnt⁸⁶, allerdings kann BAC durch seine oberflächenaktive Wirkung die Tränenfilmstabilität nachhaltig stören.^{87,88} So fördert es die Entwicklung eines Trockenen Auges und bewirkt durch einen unzureichenden Schutz des Epithels und mangelnder Verdünnung folgend eine Schädigung des Epithels. Auch eine allergisierende Wirkung von BAC wird diskutiert.^{17,21,22,89}

Tabelle 1: Beispiele von mit BAC konservierten Augentropfen

Medikament	Wirkstoff	BAC-Konzentration
Floxal®	Ofloxacin	0,025 mg/ml
Refobacin®	Gentamicinsulfat	0,03 mg/ml
Lacri-Vision®	Hypromellose	0,045 mg/ml
Otriven®	Xylometazolin	0,05 mg/ml
Timolol®	Timololmaleat	0,1 mg/ml
Livocab®	Levocabastin	0,15 mg/ml
Ecolicin®	Erythromycin + Colistinethat	0,5 mg/ml

1.4.2 Cetrimid

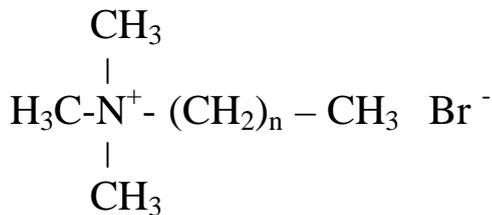


Abbildung 3: Halbstrukturformel von Cetrimid, wobei n=13 für Trimethyltetradecylammoniumbromid, n= 11 für Dodecyltrimethylammoniumbromid und n= 15 für Hexadecyltrimethylammoniumbromid bzw. Cetyltrimethylammoniumbromid

Als kationisches Tensid gehört Cetrimid wie auch BAC zu den quartären Ammoniumverbindungen und somit zu den Invertseifen (siehe Kap. 1.4.1). Das in Lösungen verwendete Cetrimid stellt eine Mischung aus hauptsächlich Trimethyltetradecylammoniumbromid mit einem geringen Anteil an Dodecyl- und Hexadecyltrimethylammoniumbromid dar.⁹⁰ Cetrimid, insbesondere Hexadecyltrimethylammoniumbromid, das auch als Cetyltrimethylammoniumbromid bezeichnet wird, bildet Komplexe mit Nukleinsäuren, die nicht mehr löslich sind.^{91,79} Ebenfalls besitzt Cetrimid antimikrobielle Eigenschaften gegen Bakterien und Pilze, aber auch gegen einige Viren, so dass es vor allem als Konservierungsmittel zum Einsatz kommt. Hierbei wird in Augentropfen vor allem eine Konzentration von 0,1mg/ml verwendet. Da Cetrimid eine dosis- und zeitabhängige toxische Wirkung auf das Epithel hat, können bei längerfristiger Anwendung allergische Reaktionen wie Lid- oder Kontaktekzeme, aber auch Irritationen des Auges mit starker Rötung und Fremdkörpergefühl mit folgender Epithelschädigung auftreten.^{20,23,79} Hierauf wird mittlerweile sogar explizit in Beipackzetteln oder in der Roten Liste hingewiesen.⁷⁸ Insgesamt ist das Nebenwirkungsspektrum von Cetrimid dem von BAC sehr ähnlich.

Tabelle 2: Beispiele von mit Cetrimid konservierten Augentropfen

Medikament	Wirkstoff	Cetrimid-Konzentration
Lacophtal®	Povidon	0,05 mg/ml
Artelac®	Hypromellose	0,10 mg/ml
Pan-Ophtal®	Dexpanthenol	0,10 mg/ml
Corneregel® Gel	Dexpanthenol	0,10 mg/g
Vidisic® Gel	Carbomer	0,10 mg/g

1.5 Zytotoxizitätstests

1.5.1 Zelltod

Was bedeutet es eigentlich, wenn eine Zelle stirbt? Ist tot nicht gleich tot? Über diese Frage machten sich anscheinend erst Kerr et al. 1972 Gedanken. Er prägte den Begriff der Apoptose und wies als Erster auf Unterschiede zur Nekrose hin.⁹² Das Wort Apoptose leitet sich von den alt-griechischen Wörtern $\alpha\beta\tau\omicron\varsigma$ „weg oder herab“ und $\pi\tau\tau\iota\varsigma$ „der Fall“ ab. Im Gegensatz zur Nekrose - $\kappa\alpha\tau\alpha\gamma\alpha\tau\omicron\varsigma$ „tot“- stellt die Apoptose einen physiologischen Vorgang dar, der Tag für Tag im menschlichen Organismus abläuft, um Zellen zu beseitigen, die entweder schwer geschädigt oder durch einen Funktionsverlust zwecklos geworden sind. Durch reaktive Sauerstoffspezies wie H_2O_2 , UV-Licht, ionisierende Strahlung, aber auch Medikamente kann eine Apoptose hervorgerufen werden. Bei Therapieformen wie der Zytostatikagabe oder der Strahlen- und Chemotherapie ist diese Induktion sogar gewollt.^{93,94}

Der passive Vorgang der Nekrose ist durch ein Anschwellen von meist mehreren Zellen gekennzeichnet, wobei auch der Kern betroffen ist und die Zellorganellen schon zu einem frühen Zeitpunkt verändert bzw. zerstört werden. Auch die Zellmembran wird zerstört, so dass das Zellinnere freigesetzt und so eine Entzündungsreaktion der Nachbarzellen hervorgerufen wird.^{95,96}

Bei der Apoptose hingegen, die auch als programmierter Zelltod oder auch Selbstmord bezeichnet wird, kommt es zu einem aktiven, also von der Zelle regulierten, Absterben einzelner Zellen. Die Nachbarzellen werden nicht beeinträchtigt und eine Entzündungsreaktion bleibt aus. Während des programmierten Zelltodes schrumpft und verdichtet sich die Zelle samt Kern und Zytoplasma, und es kommt zum „Blebbing“ bzw. der Zeiose, bei der Ausstülpungen (Protrusionen) des Zytoplasmas entstehen. Diese Ausstülpungen sind von der Zellmembran umschlossen und bilden im Laufe der Apoptose durch vollständige Abschnürung die apoptotischen Körperchen. Gleichzeitig entsteht eine Chromatinkondensation zu kleinen Granula, die sich im Randbereich des Zellkerns ablagern. Die Zellorganellen bleiben bis zu einem späten Zeitpunkt weitgehend im Gegensatz zur Nekrose erhalten. Abschließend zerfällt die Zelle in viele Einzelteile, die durch ihre Membran-Ummantelung einen Austritt des Zellinhaltes und somit eine Entzündungsreaktion verhindern. Phagozyten werden daraufhin ziemlich schnell z.B. durch eine Umverteilung von Phosphatidylserin von der Membraninnenseite auf die Membranaußenseite angelockt, und die Zellfragmente entfernt.^{93,94,95,96}

Den wichtigsten Anteil an der Apoptosevermittlung haben die Caspasen. Dies sind Cysteinyl-Aspartasen, die man in der komplexen Apoptose-Kaskade in Initiator- (z.B. (Pro)Caspase-8 oder -9) und Effektorcaspasen (Caspasen 3,6,7) unterteilt. Vereinfacht ausgedrückt, unterscheidet man außerdem zwischen einem intrinsischen, durch eine aus Mitochondrien freigesetztes Cytochrom C getriggerte Caspase-9-Aktivierung mit nachfolgender Aktivierung von Effektorcaspasen, und einem extrinsischen über TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), TNF oder Fas vermittelten⁹⁷ Aktivierungsweg von Caspase-8 mit nachfolgend direkter Effektorcaspasen-Aktivierung oder mit einer Überleitung in den intrinsischen Mitochondrien-vermittelten Weg. Insgesamt werden die Caspasen bzw. die vorgeschalteten Procaspasen autokatalytisch oder durch Spaltung in einer komplexen Kaskade aktiviert^{93,98,99,100}, wobei neuere Studien eine Aktivierung durch Dimerisation mancher als Monomere vorliegender Caspasen diskutieren.¹⁰¹ Für die Aktivierung der Apoptose spielen auch die An- bzw. Abwesenheit von Wachstums- und Überlebensfaktoren eine wichtige Rolle.^{93,98,102}

Den Mitochondrien kommt eine wichtige Stellung im Apoptoseverlauf zu, da sie zum einen als Verstärker, auf der anderen Seite aber auch als Initiatoren der Apoptose fungieren können. Dies bewerkstelligen sie durch eine Freisetzung unter anderem von Cytochrom C, AIF (apoptosis inducing factor) und Endonuklease G.^{100,103} Wird die Apoptose caspaseunabhängig über die Mitochondrien initiiert, spricht man von einem apoptoseartigen Zelltod.¹⁰⁴

Wenn die apoptotischen Zellen nicht phagozytiert werden, kann es zu einer sekundären Nekrose kommen.^{96,105}

1.5.2 Vitalitäts- und Apoptosetests

Um eine Zellschädigung nachweisen zu können, stehen vielfältige Methoden zur Auswahl. Zum einen gibt es Tests, die zwar eine Unterscheidung zwischen vital und tot erlauben, keine Aussage jedoch darüber treffen lassen, ob die Zellen durch Nekrose oder Apoptose gestorben sind. Folgend werden einige diesbezügliche Methoden exemplarisch vorgestellt.

Zu einem weit verbreiteten Vitalitätstest zählt z.B. der Neutralrot Test, der auf einer Anfärbung vitaler Zellen durch 3-Amino-7-dimethyl-amino-2-methylphenazin Hydrochlorid basiert, wobei membrangeschädigte Zellen nicht angefärbt werden. Die Auswertung erfolgt dann photometrisch. Eine weitere schnelle und einfache Vitalfärbung bietet der Janusgrün-Test, der die Zellkerne und Mitochondrien geschädigter Zellen anfärbt. Nach Extraktion des Farbstoffes durch absoluten Alkohol und anschließender photometrischer Auswertung kann die Zellzahl als

prozentualer Anteil am Gesamtzellschaden direkt angegeben werden.^{106,107} Über eine Anfärbung toter Zellen mit Trypanblau, die häufig nach Aufspaltung einer Zellkultur angewendet wird, oder dem roten Propidiumiodid kann bestimmt werden, ob die Zellmembran der Zellen noch intakt ist. Im Gegensatz hierzu gibt z.B. der MTT-Assay durch eine Reduktion und einem hierdurch entstehendem Farbumschlag eines gelben Tetrazoliums Salzes zum blau-violetten Formazan Aufschluss über die metabolische Aktivität einer vitalen Zelle, insbesondere über die Aktivität der Mitochondrien. Calcein AM passiert andererseits nur die Membran vitaler Zellen und wird dort von Esterasen zu einem grün fluoreszierenden Calcein gespalten, das die Membran hiernach nicht mehr durchdringen kann. Durch gleichzeitige Zugabe eines Ethidiumhomodimers wird eine rot fluoreszierende Färbung von toten Zellen durch Bindung an die Nukleinsäure erreicht.¹⁰⁸

Möchte man hingegen in Erfahrung bringen, welchen Tod die Zellen nun gestorben sind, bieten sich hierfür insbesondere der Annexin-V-Assay¹⁰⁹ mit Propidiumiodidgegenfärbung und der TUNEL-Assay¹¹⁰ mit z.B. Hämatoxylin-Gegenfärbung an. Beide greifen an unterschiedlichen Punkten an. Annexin-V bindet an Phosphatidylserin, das bei apoptotischen Zellen auf die Außenseite der Zellmembran wechselt, während der TUNEL-Assay Nukleotide an DNA-Strangbrüche koppelt (Näheres hierzu siehe Kap.3.5.4.1 und 3.5.3.1). Da es vorkommen kann, dass auch nekrotische Zellen mit dem TUNEL-Assay angefärbt werden, sollte immer noch ein anderer Test zusätzlich angewendet werden.¹¹¹ Eine weitere Möglichkeit zur Apoptosebestimmung kann z.B. der Nachweis aktivierter Caspasen bieten. Natürlich bleibt auch die mikroskopische Begutachtung der oben beschriebenen morphologischen Zellveränderungen, die während einer Apoptose bzw. Nekrose auftreten, eine der wichtigsten Methoden bei der Auswertung geschädigter Zellen.^{108,111}

2. ZIEL DER EXPERIMENTELLEN ARBEIT

Keratozyten spielen für den Erhalt der Hornhaut-Transparenz und bei der Wundheilung eine entscheidende Rolle. Da diese Zellen *in vitro* nur langsam wachsen, eine kurze Lebensspanne von etwa 5 Passagen haben, und für die Durchführung von größeren Studien mehrere Hornhäute zur Isolierung der Zellen nötig sind, ist eine Homogenität und eine gute Vergleichbarkeit der Kulturen in Studien nur sehr schwer zu erreichen. Aus diesem Grund sind bereits durch das Simian Virus SV40 transfizierte bzw. infizierte immortalisierte Zelllinien an humanen Epithel- und Endothelzellen etabliert worden. Diese immortalisierten Zellreihen tragen durch ihre lange Lebensspanne und erhöhte Proliferation zu einer Standardisierung und somit besseren Vergleichbarkeit in Studien bei.

Ziel der vorgestellten Arbeit war es daher, eine Zelllinie immortalisierter Keratozyten (HCKi) auf ihre Eignung für Toxizitätstests zu untersuchen. Hierzu wurden mit gängigen Konservierungsmitteln in Augentropfen behandelte primäre Keratozyten (HCKp) und HCKi miteinander verglichen. Konservierungsmittel wie Benzalkoniumchlorid oder Cetrimid, die zu den häufigsten in Augentropfen verwendeten Konservierungsmitteln gehören, stellen wie oben dargestellt insbesondere für Patienten mit chronischen Krankheiten bzw. Symptomen durch eine wiederholt notwendige Anwendung ein Problem dar. Ihre Toxizität auf Hornhautzellen sollte hier ebenfalls noch einmal evaluiert werden.

Die beiden Zellreihen wurden somit in der vorliegenden Arbeit nicht nur auf Unterschiede in der Morphologie oder ihrem Proliferationsverhalten hin untersucht, sondern auch auf ihre Reaktion auf mögliche zytotoxische Substanzen. Hierbei war insbesondere die Sensitivität der Zellen für diese Substanzen von Interesse. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob eine mögliche Schädigung der Zellen auf einen passiven Nekrose- oder einen programmierten Apoptose-Tod zurückzuführen war, wurden die Zellen mittels Zytotoxizitätstests (TUNEL- und Annexin-V/Propidiumiodid-Assay) unter dem Durchlicht- bzw. Fluoreszenzmikroskop begutachtet.

Insgesamt ist die Etablierung einer immortalisierten Keratozytenlinie auch unabdingbar bei der Entwicklung eines dreischichtigen Cornea-Äquivalentes, das in den letzten Jahren in der Forschung deutlich an Interessenzuwachs gewonnen hat. Einen weiteren Punkt stellt die Frage dar, ob die Verwendung von HCKi in Zytotoxizitätsstudien einen guten Ersatz einerseits für primäre Zellen, andererseits für den Draize-Test und somit für Tierversuche darstellt.

Ziel der Arbeit war zusammenfassend eine *in vitro* vergleichende Analyse von primären und immortalisierten Keratozyten anhand von Zytotoxizitätstests mit Konservierungsmitteln für Augentropfen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Primäre HCK (HCKp)

3.1.1 Isolierung primärer HCK

Primäre Keratozyten wurden aus Hornhäuten isoliert, die von der Hornhautbank Berlin der Charité aufgrund ihrer Nicht-Eignung zur Transplantation zur Verfügung gestellt wurden. Unter einer sterilen Werkbank wurde die Hornhaut zuerst mehrfach in PBS (phosphate buffered saline) gründlich gespült, danach wurde mit einem sterilen Skalpell #10 sowohl die Epithel- als auch die Endothelschicht entfernt. Nach vollständiger Entfernung beider Schichten wurde die Hornhaut nochmals gründlich in PBS gespült um etwaige Reste zu lösen. Mit einer sterilen Schere wurde der Limbus Corneae entfernt, wobei kleinere Reste mit einem sterilen Skalpell beseitigt wurden, bis nur noch die klare Cornea übrig blieb. Die Cornea wurde nun mit der sterilen Schere in möglichst kleine Stücke zerteilt, die mit einer sterilen Pinzette in eine Petrischale (Easy Grip; Zellkulturschale 35x10mm; Falcon®; Becton Dickinson Labware) überführt wurden.

Auf die Gewebestücke wurde nun steril filtrierte 1%ige Collagenase Typ I (Sigma) gegeben, um die im Kollagenbett liegenden Keratozyten lösen zu können, wobei die Hornhaut-Stücke danach im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ für 40 Minuten inkubiert wurden. Nach der angegebenen Inkubationszeit wurden die Cornea-Stücke unter der sterilen Werkbank in ein 15ml Zentrifugenröhrchen (BLUE MAX® Polystyrene tubes; Falcon; Becton Dickinson Labware) mit einer Pinzette vorsichtig überführt und mit kaltem DMEM + 10% FCS (Dulbecco's modified Eagles medium DMEM+ 10% fetales Rinderserum (FCS), 1% Penicillin/Streptomycin, 0,1% Gentamycin, 1% Amphotericin B, 2,5% HEPES-Puffer) aufgefüllt, um die Collagenase-Reaktion größtenteils zu stoppen. Nach einer Zentrifugierung von 10 Minuten bei 1000 Umdrehungen und 15°C wurde das Medium unter der sterilen Werkbank abpipettiert und die Gewebestücke mittels Pinzette in mehrere Zellkulturschalen (Easy Grip; Zellkulturschale 35x10mm; Falcon®; Becton Dickinson Labware) mit etwa 2ml Keratozyten-Medium F99Kera + 10% FCS überführt, um ein möglichst große Zellausbeute zu gewährleisten, und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Es wurden auch Ansätze mit Collagenase Typ I (Sigma) in den Konzentrationen 0,5% bis 2,5% und Collagenase Typ IV (Sigma) in den Konzentrationen 0,5% bis 2,5% bei variablen Inkubationszeitspannen erprobt. Dabei zeigten sich die besten Ergebnisse bei der Benutzung von 1%iger Collagenase Typ I bei einer Inkubation von 40 Minuten, so dass nur noch mit dieser Methode die primären Keratozyten isoliert wurden.

3.1.2 Zellkultivierung

Nach etwa 7 bis 14 Tagen zeigte sich in den Zellkulturschalen ein beginnendes Wachstum der Keratozyten aus den Gewebestücken heraus. Nach 5 Tagen wurden die Gewebestücke unter einem inversen Lichtmikroskop (Leica DMIRB) auf ihre Morphologie hin untersucht, gegebenenfalls wurden einige Tropfen frisches Keratozytenmedium F99Kera + 10%FCS zugefügt. Nach 8 Tagen wurde das Medium vorsichtig abpipettiert und 2ml frisches Keratozytenmedium F99Kera + 10% FCS zugefügt. Sobald eine ausreichende eigenständige Wachstumskapazität gewährleistet war, wurden die Gewebestücke aus den Zellkulturschalen entfernt. Etwa alle 3 Tage wurden die Zellen unter dem inversen Mikroskop beurteilt und das Medium gewechselt. Bei ausreichender Wachstumskapazität wurde der FCS-Anteil des Mediums auf 5% herabgesetzt. Zeigte sich nach 4 bis 6 Wochen immer noch kein Wachstum der Keratozyten, so wurden die Proben verworfen.

3.1.3 Keratozytenmedium:

Zusammensetzung:

- F99Kera Medium 199 (Gibco BRL) und Medium Ham's F12 (Gibco BRL) zu gleichen Teilen
- 10% bzw. 5% fetales Rinderserum FCS (Biochrom KG)
- 0,05µg/ml Gentamycin (Gibco BRL)
- 20µg/ml Insulin (Sigma)
- 2,5µg/ml Amphotericin B (Gibco BRL)
- 100U Penicillin/Streptomycin (Gibco BRL)
- 20µg/ml Ascorbinsäure (Sigma)
- 0,4µg/ml Chondroitinsulfat (Sigma)

Für die Herstellung von ca. 100ml Keratozytenmedium wurden also verwendet:

- F99Kera Medium 199 (Gibco BRL) und Medium Ham's F12 (Gibco BRL) zu gleichen Teilen
- 10 bzw. 5ml FCS
- 100µl Gentamycin [50µg/ml]
- 2ml Insulin [1000µg/ml]
- 1ml Amphotericin [250µg/ml]

- 1ml Penicillin/Streptomycin [10.000U]
- 2mg Ascorbinsäure
- 40mg Chondroitinsulfat

Die Inhaltsstoffe wurden unter der Werkbank gemischt, hierbei wurde ein pH-Wert von 7,2 – 7,4 angestrebt. Die pH-Wert-Einstellung erfolgte mittels steriler NaOH- und HCL-Lösung, deren Wirkung mit pH-Papier oder pH-Meter kontrolliert wurde; anschließend wurde die fertige Lösung steril filtriert (Corning®; Corning incorporated; 150ml Filtersystem; 0,22µm CA (Cellulose Acetate)).

Dieses Keratozytenmedium ist in seinen Bestandteilen mit in anderen Keratozyten-Studien verwendeten Medien vergleichbar:

Tabelle 3: Von anderen Arbeitsgruppen verwendetes Keratozytenmedium

Arbeitsgruppe	Keratozytenmedium
Bourcier T, Rondeau N, Paquet S, et al. ¹¹²	1:1 Medium199 und Ham's F12 Medium; 2,5%FCS; 20µg/ml Insulin; 20µg/ml L-Ascorbinsäure; 0,4 mg/ml Chondroitinsulfat; 2mM L-Glutamin; 100 IU/ml Penicillin; 100µg/ml Streptomycin; 0,25 µg/ml Amphotericin; 250 ng/ml Heparin; 10ng/ml aFGF
Borderie VM, Mourra N, Laroche L ¹¹³	1:1 Medium199 und Ham's F12 Medium; 20µg/ml Ascorbinsäure; 20µg/ml Insulin; 0,4mg/ml Chondroitinsulfat; 250ng/ml Heparin; 2mM L-Glutamin; 100 IU/ml Penicilin; 100µg/ml Streptomycin; 0,25µg/ml Amphotericin; abwechselnd 10% FCS, 10ng/ml aFGF, 10ng/ml bFGF oder 40ng/ml HGF
Borderie VM, Lopez M, Lombet A, et al. ¹¹⁴	1:1 Medium199 und Ham's F12 Medium; 10% FCS; 20µg/ml Insulin; 20µg/ml Ascorbinsäure; 0,4mg/ml Chondroitinsulfat; 250ng/ml Heparin; 2mM L-Glutamin; 100 IU/ml Penicillin; 100µg/ml Streptomycin; 0,25 µg/ml

	Amphotericin; 10ng/ml aFGF; zum Teil auch bFGF
Zorn-Kruppa M, Tykhonova S, Belge G, et al. ⁶⁷	1:1 Medium 199 und Ham's F12 Medium; 5% FCS; 1% antibiotic/antimycotic (enthält 10000 U/ml Pemicillin, 10000mg/ml Streptomycin); 25 µg/ml Amphotericin

3.1.4 Passage der primären Zellkultur:

Sobald eine Konfluenz von mindestens 80% vorhanden war, wurden die Zellen nach folgendem Protokoll passagiert.

Die Gewebestückchen wurden aus der Zellkulturschale entfernt und die Zellen mit PBS (phosphate-buffered saline) mehrmals gespült, um etwaige Mediumreste oder Zelldetritus zu entfernen. Danach wurden die Zellen durch 0,5 ml AccutaseII (=Alfazyme; PAA Laboratories) bei 37°C über 6-8 Minuten von dem Zellkulturschalenboden gelöst. Das Enzym Accutase II, das sowohl proteolytische als auch kollagenolytische Eigenschaften aufweist, wirkt zwar etwas langsamer als Trypsin, ist dafür aber sehr schonend für die Zellen. Außerdem ist ein Abstoppen der Reaktion wie bei Trypsin im Grunde nicht nötig, da die Wirkung nach ca.10 Minuten von selbst nachlässt, es sollte jedoch trotzdem darauf geachtet werden, die Enzymreste mit DMEM + 10% FCS und Zentrifugieren zu entfernen.

Nach etwa 4-5 Minuten wurde der Ablösungsvorgang unter dem inversen Mikroskop kontrolliert und die Zellkulturschale etwas geschwenkt und gegebenenfalls vorsichtig von unten mit den Fingerspitzen beklopft. Hatten sich die Zellen vom Boden gelöst, wurde die Zellsuspension unter der sterilen Werkbank in ein 15ml Zentrifugenröhrchen (BLUE MAX® Polystyrene tubes; Falcon; Becton Dickinson Labware) überführt und mit kaltem DMEM + 10% FCS aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde über 10 Minuten bei 1000 Umdrehungen pro Minute und 15°C zentrifugiert und der Überstand danach vorsichtig abpipettiert. Nach Zugabe von etwa 500µl Keratozytenmedium F99Kera wurde das Zell-Pellet resuspendiert und in 50ml Zellkulturflaschen (25cm²; Falcon; Becton Dickinson Labware), die mit etwa 4-5ml F99Kera Medium befüllt waren, eingebracht. Auf eine Zellzahlbestimmung wurde vor dem Aussäen der Zellsuspension in die Zellkulturflaschen verzichtet. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert und nach 2-3 Tagen unter dem inversen Mikroskop auf ihre Adhärenz hin überprüft, die bei fast allen vitalen Zellen nach diesem Zeitraum gegeben war.

Nach etwa 2 Wochen war eine erneute Passage nötig, wobei 1ml AccutaseII verwendet wurde, um die Zellen vom Boden der Zellkulturschale zu lösen. Das entstandene Zell-Pellet wurde in F99Kera resuspendiert und in eine 250ml Zellkulturflasche (75cm²; Falcon; Becton Dickinson Labware) mit 10-12ml Medium, das nun auf 5%iges F99Kera umgestellt wurde, eingebracht.

Bei erneuter Passage wurden die Zellen mit 2ml AccutaseII gelöst, im Verhältnis 1:2 gesplittet und jeweils in 250ml Zellkulturflaschen eingebracht, wobei die Zellen dann entweder für Versuche verwendet wurden oder eingefroren wurden.

3.2 Immortalisierte HCK (HCKi)

3.2.1 Isolierung/ Herstellung immortalisierter HCK

Eine Zelllinie von immortalisierten HCK wurde freundlicher Weise von der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Engelke vom Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin zur Verfügung gestellt.

Primäre isolierte Keratozyten wurden nach der ersten Passage bis zu einer 60%igen Konfluenz herangezüchtet und dann mit 5µg pSV40-dN-Plasmid, das die frühe Gen-Region enthält, über zwei Stunden inkubiert. Nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gespült und in F99 Medium + 15% FCS und 1% Antibiotic/Antimycotic-Lösung kultiviert. Sobald eine Transformation der Zellen mit Focus-Bildung sichtbar wurde, erfolgte eine Subkultivierung ebendieser HCKt für etwa 23-29 Passagen. In den folgenden Monaten gingen mehrere dieser Subkulturen unter. Die verbliebenen immortalisierten HCK-Kolonien wurden zusammengenommen und konnten etwa 2 mal in der Woche weiterpassagiert werden, sodass über 70 Passagen erreicht werden konnten.^{67,68}

3.2.2 Kultivierung immortalisierter HCK

Alle 2 Tage wurde das Medium gewechselt und die Zellen auf ihre Morphologie hin unter einem inversen Mikroskop untersucht. Die Zellen zeigten im Vergleich zu den primären Keratozyten ein stärkeres und resistenteres Wachstum, reagierten jedoch auf das Keratozytenmedium F99Kera mit deutlichem Verlust der Vitalität (eigene Beobachtung), der möglicherweise auf das enthaltene Insulin zurückzuführen ist. Daher wurde für die Kultivierung ein reduziertes Medium gewählt, im folgendem als F99Immort bezeichnet.

Zusammensetzung von F99Immort:

- Medium F99 Zu gleichen Teilen Medium199 (Gibco BRL) und Ham's F12 (Gibco BRL)
- 1% Antibiotic/Antimycotic (Gibco BRL)
- 5% FCS (Biochrom KG)

Das ergibt für 500ml F99Immort:

- 25ml FCS (Biochrom KG)
- 5ml Antibiotic/Antimycotic

Der optimale pH-Wert, der durch pH-Papier oder pH-Meter bestimmt wurde, lag bei 7,2-7,4. Eingestellt werden konnte der pH-Wert mittels steriler NaOH- bzw. HCL-Lösung. Anschließend wurde das Medium steril filtriert (Corning®; Corning incorporated; 150ml Filter System; 0,22µm Cellulose Acetate) und aliquotiert.

3.2.3 Passage immortalisierter HCK

Aufgrund des schnelleren Wachstums war eine Passage etwa 1-2 Mal pro Woche nötig, die nach dem für die primären HCK beschriebenen Protokoll durchgeführt wurde. Die Zellkulturflaschen (250ml; 75cm²; Falcon; Becton Dickinson Labware) wurden im Verhältnis von 1:3 gesplittet und mit 15ml F99Immort aufgefüllt. Meist war nach weiteren 2-3 Tagen wieder eine vollständige Konfluenz gegeben. Die Zellen wurden für eine längerfristige Lagerung kryokonserviert und bei Bedarf aufgetaut.

3.3 Weitere Medien

DMEM + 10% FCS zum Passagieren von HCKp/HCKi und für die Isolierung von HCKp. Es wurde das in den Laboren der Augenklinik gängige Rezept verwendet.

Zusammensetzung:

Auf 100ml DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium von Gibco BRL)

- 10ml Fetal Calf Serum FCS (Biochrom KG)
- 1ml Penicillin/Streptomycin 10000 U (Gibco BRL)
- 100µl Gentamycin 50µg/ml (Gibco BRL)
- 1ml Amphotericin B 250µg/ml (Gibco BRL)
- 2,5 ml HEPES 1molar (eigene Herstellung)

3.4 Einfrieren und Auftauen von Zellkulturen

Um größere Mengen von primären und immortalisierten HCK aufbewahren zu können, wurden die HCKp-Zellen in der 2. und 3. Passage und HCKi-Zellen ab der 26. Passage bei -80°C kryokonserviert. Für diese Kryokonservierung wurde ein Einfriermedium und ein Protokoll benutzt, das in den Laboren der Augenklinik Charité bereits erfolgreich eingesetzt wurde.

Die Zusammensetzung des Einfriermediums lautete für ca. 12ml: 10ml DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium), 1ml FCS, 1ml DMSO (Hybri-Max®; Sigma), 50µl Glucose, 110µl Penicillin/Streptomycin.

Dimethylsulfoxid (DMSO) dient in dem Einfriermedium als Gefrierschutz, da er den Gefrierpunkt herabsetzt und so eine Verlangsamung der Abkühlungsrate bewirkt; dabei ist aber zu beachten, dass DMSO bei längerer bzw. unsachgemäßer Einwirkzeit selber zytotoxisch wirkt.

Die Zellen wurden wie in 3.1.4 dargestellt durch Accutase II von den Zellkulturflaschenböden gelöst und mit kaltem DMEM +10% FCS für 10 Minuten bei 1000 Upm und 15°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Zell-Pellet mit 2ml im Wasserbad erwärmten Einfriermedium versetzt. 1,8ml der Zellsuspension wurden auf die Cryo Tubes (NUNC) verteilt und bei 500 Umdrehungen für 2 Minuten bei 15°C kurz abzentrifugiert. Danach wurde das Medium bis 0,8 ml abpipettiert und das Gefrierrohrchen bei 4°C im Kühlschrank für 15 Minuten gelagert, um ein Diffundieren des DMSOs in die Zellen zu gewährleisten, bevor es dann bei -80°C zur Lagerung eingefroren wurde.

Bei Bedarf wurden die Röhrchen wieder im Wasserbad aufgetaut, wobei darauf geachtet wurde, dass die Zellen nicht überhitzt und nach Abtauen des letzten Eises, die Zellen schnell weiterverarbeitet wurden, um den zytotoxischen Effekt von DMSO zu minimieren. Tropfenweise wurde nun das jeweilige Keratozytenmedium zugesetzt bis ein Verhältnis von etwa 1:20 erreicht war. Hiernach wurden die Zellen für 5 Minuten bei 1800 Upm und 15°C zentrifugiert, das Zell-Pellet in frischem Keratozytenmedium aufgenommen und auf 250ml Zellkulturflaschen (75cm²; Falcon; Becton Dickinson Labware) verteilt.

3.5 Auswertungsmethoden

3.5.1 Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer

Für die Bestimmung einer definierten Zellzahl bei der Durchführung des Versuchsaufbaus wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet. Die Kammer besteht aus neun großen Quadraten mit einer Tiefe von 0,1mm. Nach Aufsetzen des Deckglases und Erscheinen der Newtonschen Ringe wird die Zellsuspension 1:2 mit 0,5%igem Trypanblau gemischt und mittels Pipette in die Zählkammer gefüllt (10µl), wobei an der Kante angesetzt wird, so dass Kapillarkräfte das Einsaugen der Suspension bewirken. Die Auswertung erfolgte unter dem Mikroskop.

Berechnet wurde die Lebendzahl nach folgender Formel:

$$\begin{aligned} \text{Zellzahl/ml} &= \text{Lebend-Mittelwert aus vier Quadraten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor} \\ &= n \times 2 \times 10^4 \end{aligned}$$

Zur Gesamt-Lebend-Zellzahlbestimmung muss das Volumen der Zellsuspension noch berücksichtigt werden.

3.5.2 Proliferationsmessung mittels Cell Analysing System (CASY 1)

3.5.2.1 Messprinzip des Zellcounters

Die Partikelmessstechnik mit ihrem Widerstandsmessprinzip bildet die Basis der CASY 1 Technologie, die durch Kombination mit der Pulsflächenanalyse eine gute Auswertungsmöglichkeit mit hoher Reproduzierbarkeit darstellt. Die Zellen werden in einer isotonen Elektrolytlösung suspendiert und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Messkapillare definierter Größe gesaugt. Die Messkapillare besteht aus einem Rubin mit durch Bohrung entstandener Präzisionsmesspore, die in den Kapillarkörper eingegossen wurde. Über zwei Platinelektroden wird während der Messung eine elektrische Spannung an die Kapillarstrecke angelegt. Beim Durchtritt einer Zelle durch die Kapillare entsteht durch Widerstandsänderung, die durch Verdrängung eines der Zelle entsprechenden Volumens der Elektrolytlösung entsteht, ein elektrischer Puls. Da intakte Zellen am ehesten einem Isolator entsprechen, entsteht entlang der Kapillarstrecke eine Widerstandserhöhung. Diese Widerstandsänderung wird als Maß für das Volumen der Zellen genommen, wobei dies nur gewährleistet werden kann, wenn die Zellen die Kapillare einzeln passieren.

Bei der Pulsflächenanalyse werden die von den Zellen verursachten Pulse nach ihrer Größe differenziert, so dass eine Einteilung in vitale Zellen, tote Zellen und Zelltrümmer erfolgen kann, da tote Zellen kleiner dargestellt werden als vitale.

3.5.2.2 Messprotokoll

- Leermessung vor jeder Messreihe zur Spülung der Kapillare und zur Überprüfung des background Signals
- Zellen wurden mit AccutaseII wie oben beschrieben von der Unterlage der 12-Well Kulturschalen gelöst und vorsichtig in Zentrifugenröhrchen überführt
- Etwa 5minütige Zentrifugierung bei 1000 Umdrehungen und 15°C
- Abpipettierung des Überstandes und Hinzufügen von 500µl des jeweiligen Mediums
- Überführung der Zellsuspension in CASY 1 Messröhrchen mit 9,5ml isotoner Messlösung (Casyton, Schärfe System Reutlingen)
- Messung mit CASY 1:

↴ gewählte Einstellungen:	Messkapillare	150µm
	Messvolumen	400µl
	Messwiederholungen	3
	Vedünnung	20
	Kalibrierung	0-50µm
	Cursoreinstellungen (X-Achse):	
	↴ HCKp	CL: 13.96 CR: 50.00µm NL: 5.81 NR: 50.00µm
	↴ HCKi	CL:10.01 CR: 50.00µm NL: 5.81 NR: 50.00µm

3.5.2.3 Auswertung der Messungen

Die Messergebnisse werden vom Gerät als graphische Darstellung angegeben. Dabei wurden aufgrund von eigenen Beobachtungen und den empfohlenen Vorgaben des Hersteller die oben genannten Cursoreinstellungen gewählt. Vitale Zellen zeigten sich in einem Peak im Bereich von 13.96-50µm bei primären HCK und von 10.01-50µm bei immortalisierten HCK. Der Messbereich von 5.81-50µm erfasste die Gesamtzellzahl, sodass ein zweiter Peak mit toten Zellen im Bereich von 5.81-13.96 µm bzw. 10.01µm zur Darstellung kam (Abb.4). Dies entspricht dem Messbereich der sich bei Versuchen mit CASYblue zum Abtöten vitaler Zellen zeigte. Unter diesem Bereich wurden die Zelltrümmer angezeigt, die aufgrund der Voreinstellungen nicht mitgezählt wurden. Die Gesamt- und die Lebend-Zellzahl wurde pro ml angegeben, außerdem berechnete der CASY 1 einen prozentualen Wert der Vitalität der vitalen Zellen.

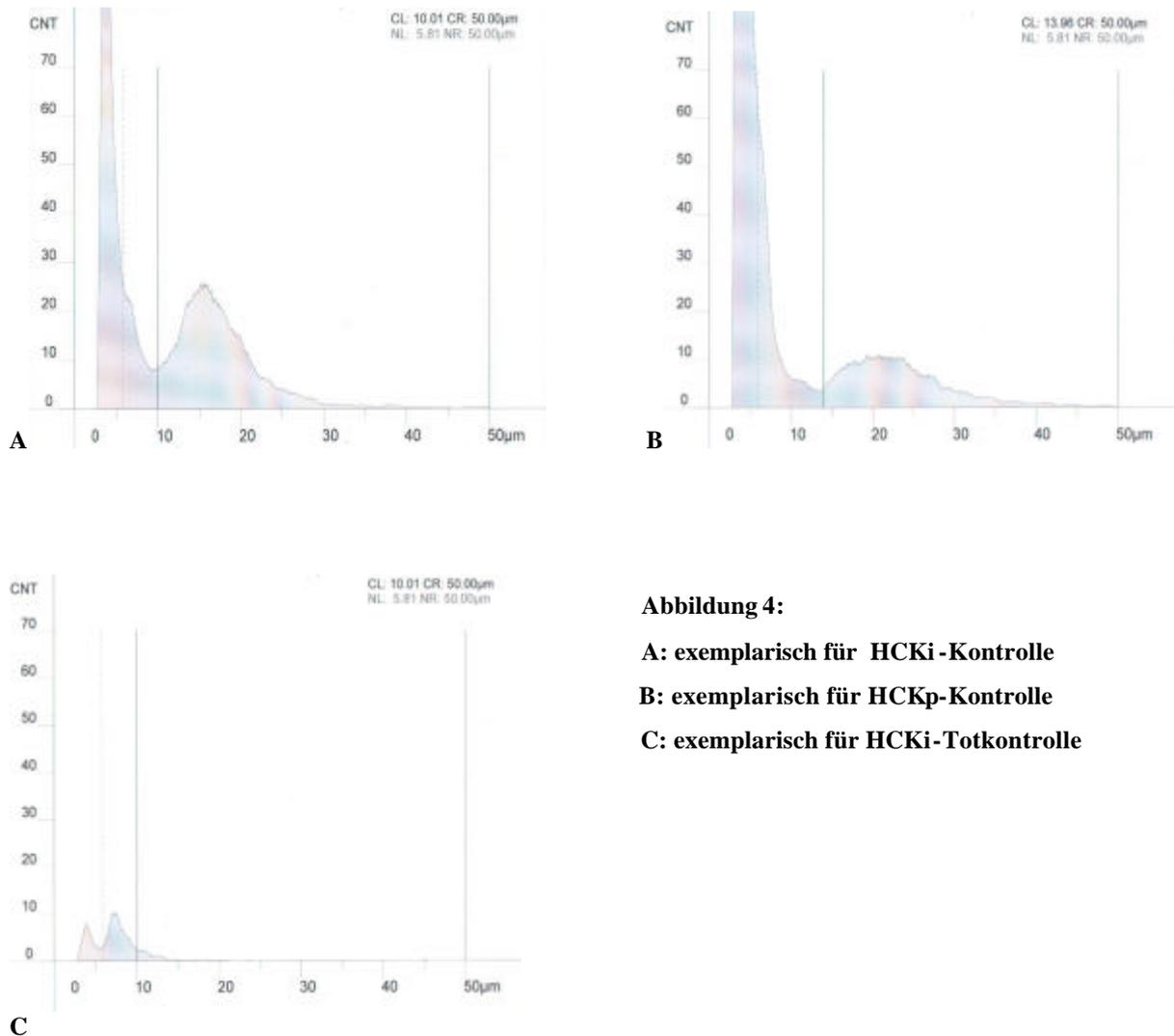


Abbildung 4:

A: exemplarisch für HCKi-Kontrolle

B: exemplarisch für HCKp-Kontrolle

C: exemplarisch für HCKi-Totkontrolle

3.5.2.4 Berechnung der Verdopplungszeit

Die Verdopplungszeit, auch Generationszeit genannt, gibt die Zeitdauer an, die eine Kultur braucht, um eine neue Generation von Zellen hervorzubringen. Dies ist zum einen ein nützlicher Parameter zur Charakterisierung von Zellen, zum anderen lassen sich aufgrund der Verlängerung oder der Verkürzung der Verdopplungszeit im Vergleich zur Kontrolle Rückschlüsse auf die Wirkung der einzelnen Wirkstoffe und der Substanzkonzentrationen ziehen.

Die Verdopplungszeit (t_v) berechnet sich aus der eingesäten Zellzahl, also zum Zeitpunkt N_0 und der Zellzahl der vitalen Zellen zum Ablesezeitpunkt N , unter Berücksichtigung der Kulturdauer in Stunden ($t = 96h$). Eine gewisse Ungenauigkeit der Formel lässt sich aufgrund der Differenz von gesamter Kulturdauer (96h) bei nur 72stündiger Einwirkzeit der Substanz nicht vermeiden.

$$t_v = \frac{\text{Log}2 \times t}{\text{Log} N - \text{Log} N_0}$$

3.5.3 TUNEL-Assay

3.5.3.1 Prinzip des TUNEL-Assays

Zum Nachweis von apoptotischen Zellen wurde ein TUNEL-Assay (In Situ Cell Death Detection Kit, Roche) verwendet. TUNEL steht für Terminal Transferase mediated dUTP Nick End Labeling. Hierbei werden DNA-Strangbrüche mittels terminaler Desoxyribonukleotid-Transferase (TdT) markiert, indem eine Kopplung von markierten Nukleotiden dUTP-Digoxigenin (desoxyUridintriphosphat-Digoxigenin) an freie 3'-OH-Enden der Einzel- bzw. Doppel-Strangbrüche bewirkt wird. Ein mit Peroxidase gebundener Anti-Digoxigenin-Antikörper, der an Digoxigenin bindet, wurde hinzugegeben. Anti-Fluorescein, das an Peroxidase (POD) gebunden vorliegt, und das Farbsubstrat Diaminobenzidin (DAB) machen die DNA-Strangbrüche dann unter dem Durchlicht-Mikroskop durch Braunfärbung der apoptotischen Zellen sichtbar. Weitere mögliche Kopplungspartner der Nukleotide sind Fluorescein oder Biotin. Bereits nach Zugabe des TUNEL-Mix können die apoptotischen Zellen im Fluoreszenz-Mikroskop begutachtet werden. Durch Gegenfärbung der vitalen Zellen mit Hämatoxylin ergibt sich ein guter Kontrast zu den apoptotischen Zellen, so dass die Zellen im Durchlicht-Mikroskop angeschaut werden können.^{110,111,115,116}

3.5.3.2 Färbeprotokoll

- 10 min. in Alufolie Auftauen der eingefrorenen Objektträger
- 2 min. Nachfixieren mit Aceton
- jeweils 3 min. 3 x in PBS spülen
- 20 min. blocken in 2%igem Wasserstoffperoxid in PBS gelöst
- jeweils 3 min. 3 x in PBS spülen
- 2 min. in 0,1%igem Triton in Natriumcitratpuffer (0,1M) bei 4°C permeabilisieren
- jeweils 3 min. 3 x in PBS spülen
- Pro Kammer 50µl TUNEL-Mix (15µl Lösung 1 + 135µl Lösung 2) hinzugeben
- 60 min. bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubieren
- jeweils 3 min. 3 x in PBS spülen
- 50µl POD-Converter je Kammer zugeben
- 30 min. bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubieren
- jeweils 3 min. 3 x in PBS spülen
- 50µl DAB Substratsolution (1:10 in Substratpuffer verdünnt) je Kammer zugeben

- 10 min. bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubieren lassen
- jeweils 3 min. 3 x in PBS spülen
- 2 min. Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Ehrlich
- Säubern und einbetten (Immu-Mount, Thermo Elektron Corporation)

Für Negativkontrollen wurde statt des TUNEL-Mix nur der Puffer (Lösung 2) zugegeben.

PBS-Ansatz für Färbezwecke:

Auf 1 Liter:

- 8 g Natriumchlorid (NaCl)
- 0,2 g Kaliumchlorid (KCl)
- 1,44 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na_2HPO_4)
- 0,24 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH_2PO_4)

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

3.5.4 Annexin-V-Fluorescein/ Propidiumiodid-Assay

3.5.4.1 Prinzip der Fluoreszenzfärbung mittels Annexin-V-Fluorescein und Propidiumiodid

Bei vitalen Zellen befindet sich das Membranphospholipid Phosphatidylserin auf der Innenseite der Zellmembran. Bereits in einem früh-apoptotischen Stadium kommt es zu einer Translokation von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zellmembran. Dies lässt sich mit Annexin-V-Fluorescein, einem Ca^{2+} -abhängigen Bindungsprotein, nachweisen, indem dieser sich an negativ geladene Phospholipide, insbesondere an Phosphatidylserin, bindet. Die Bindung erfolgt ausschließlich auf der Außenseite der Zellmembran, da Annexin-V-Fluorescein eine intakte Zellmembran nicht passieren kann. Ist die Zelle jedoch nekrotisch, kann Annexin-V-Fluorescein die Zellmembran aufgrund der nun fehlenden Membran-Integrität passieren und an der Innenseite der Zellmembran an Phosphatidylserin binden. Um eine eindeutige Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen zu gewährleisten, muss eine Gegenfärbung mit Propidiumiodid erfolgen. Propidiumiodid, das nur durch beschädigte Zellmembranen hindurch passieren kann, färbt selektiv die DNA nekrotischer Zellen an.^{109,117,118}

Fluorescein sollte in einem Spektrum von 450-500 nm angeregt werden, sodass Annexin-V-positive Zellen bei einer Wellenlänge von 515-565 nm (grün) sichtbar werden. Propidiumiodid

dagegen sollte in einem Bereich von 488-540 nm angeregt werden, sodass Propidiumiodid bei etwa 617 nm (rot) sichtbar wird.¹¹⁹ Hieraus ergibt sich für die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop:

- Annexin-V-negativ und Propidiumiodid-negativ => vitale Zellen
- Annexin-V-positiv und Propidiumiodid-negativ => früh-apoptotische Zellen
- Annexin-V-positiv und Propidiumiodid-positiv => spät-apoptotische/ nekrotische Zellen
- Annexin-V-negativ und Propidiumiodid-positiv => nekrotische Zellen

3.5.4.2 Färbeprotokoll für das Annexin-V-Fluorescein/Propidiumiodid- Assay

- 10 min. Objektträger auftauen lassen
- 2 min. mit Aceton nachfixieren
- jeweils 3 x 3 min. in PBS spülen
- Annexin-V/Propidiumiodid-Lösungsansatz für 2 Objektträger:
250µl Puffer (3) + 5µl Annexin-V (1) + 5µl Propidiumiodid (2)
- Davon je 100µl auf einen Objektträger geben, gut verteilen und in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur für 30 min. dunkel inkubieren lassen
- Kurz in PBS spülen
- DAPI-Ansatz (zum Anfärben des Chromatins aller Zellen) für 2 Objektträger:
1µl auf 200µl PBS
- Davon je 100µl auf einen Objektträger geben und 2 min. einwirken lassen
- In PBS kurz spülen
- Säubern und eindecken (Immu-Mount, Thermo Elektron Corporation)
- Dunkel im Kühlschrank lagern

3.6 Versuchsaufbau

3.6.1 Proliferationsversuche mit Benzalkoniumchlorid und Cetrimid

Nach ausreichender Konfluenz wurden sowohl die primären als auch die immortalisierten Keratozyten wie oben beschrieben mit AccutaseII aus den Kulturflaschen gelöst. Nach der darauf folgenden Zentrifugation von 10 Minuten bei 1000 Umdrehungen wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer und Trypanblau-Färbung bestimmt und jeweils 10.000 Zellen pro Well in eine mit je 490µl F99Kera (enthält 10% FCS) bzw. F99Immort (enthält 5% FCS) befüllten 12-Well Zellkulturplatte (Falcon®, becton Dickinson Labware) eingesät. Dabei wurden immortalisierte HCK der 27.Passage und primäre HCK der 3.Passage gewählt. Die primären HCK stammten für den Benzalkoniumchlorid-Versuch von einem 57-jährigen männlichen Spender und für den Cetrimid-Versuch von einem 62-jährigen männlichen Spender. Die Zellkulturschalen wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO inkubiert.

24 Stunden später wurden die Zellen auf ihre Adhärenz hin unter dem Mikroskop untersucht. 10µl der jeweiligen Konzentration wurden nun in die Wells pipettiert. Dabei wurde die Konzentration der Konservierungsstoffe so errechnet, dass sie erst auf den Zellen zusammen mit dem Medium die Endkonzentration ergab. Begonnen wurde mit der in Augentropfen gängigen Konzentration, wobei immer weiter runterdosierte wurde bis eine der Kontrolle vergleichbare Zellzahl gemessen werden konnte. Pro Konzentration wurden etwa 10-12 Wells untersucht.

Tabelle 4: Verwendete Konzentrationen bei den Proliferationsversuchen

HCKp/ HCKi	Kontrolle	40µg/ml	4µg/ml	0,4µg/ml	0,2µg/ml	0,1µg/ml
Benzalkoniumchlorid						
HCKi Cetrimid	Kontrolle	100µg/ml	10µg/ml	1µg/ml	0,1µg/ml	
HCKp Cetrimid	Kontrolle	100µg/ml	10µg/ml	1µg/ml	0,1µg/ml	0,01µg/ml

Nach ca.72 Stunden wurden die Wells mikroskopisch begutachtet und Fotos zur Dokumentation gemacht. Anschließend erfolgte eine Spülung der Zellen mit PBS mit darauf folgender Ablösung der Zellen mittels AccutaseII vom Well-Boden. Die Reaktion wurde mit kaltem DMEM + 10%FCS abgestoppt, weiterhin wurden die Zellen bei 1000 Umdrehungen für 10 Minuten bei 15°C zentrifugiert. Das Medium wurde durch 500µl frisches Medium F99Kera bzw.F99Immort ersetzt. Die Zellsuspension wurde nun vorsichtig in einen CASY-Messbecher überführt und mit Casyton auf 10ml aufgefüllt. Nach mehrmaligem vorsichtigen Schwenken wurde die Messung mit dem CASY 1-Messgerät mit den oben genannten Einstellungen durchgeführt.

3.6.2 Durchführung des TUNEL-Assays

Zellen der Passage 28 bei HCKi und der Passage 3 bei HCKp wurden auf Objektträgern angezüchtet (LAB-TEK®, Chamber Slide™ System, Nalge Nunc International). Jeweils 10.000 Zellen wurden in 490µl Medium ausgesät und über 24 Stunden bei 37°C und 5% CO inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin auf ihre Morphologie hin unter dem Durchlicht-Mikroskop begutachtet und mit 10µl der jeweiligen Konzentration versetzt. Nach ca.72 Stunden weiterer Inkubation wurde der Überstand abpipettiert und die Kammern von den Objektträgern entfernt. Die Objektträger wurden kurz in PBS gespült und anschließend für 10 Minuten in Aceton fixiert. Danach erfolgte die Einschließung der Objektträger in Parafilm und Alufolie. Zur Lagerung wurden die Objektträger bei -20°C gelagert.

Zur Färbung wurde das bereits oben beschriebene Protokoll verwendet. Dabei wurde darauf geachtet, dass zwischen den einzelnen Schritten keine Austrocknung erfolgte.

Tabelle 5: Verwendete Konzentrationen beim TUNEL-Assay

HCKp/ HCKi Benzalkoniumchlorid	Kontrolle	Negativ(Leer)- Kontrolle	40µg/ml	0,4µg/ml	0,2µg/ml	0,1µg/ml
HCKp Cetrimid	Kontrolle	Negativ(Leer)- Kontrolle	100µg/ml	1µg/ml	0,1µg/ml	0,01µg/ml
HCKi Cetrimid	Kontrolle	Negativ(Leer)- Kontrolle	100µg/ml	1µg/ml	0,1µg/ml	

Es wurden Fotos zur Dokumentation angefertigt.

3.6.3 Durchführung des Annexin-V-Fluorescein/Propidiumiodid-Assays

Bis zur Lagerung bei -20°C der Objektträger erfolgte die selbe Prozedur wie bei dem TUNEL-Assay. Zur Färbung wurde das unter 3.5.4.2 beschriebene Protokoll verwendet. Dabei wurde darauf geachtet, eine Austrocknung der Objektträger zwischen den einzelnen Schritten zu vermeiden. Nach der Färbung wurden die Objektträger lichtundurchlässig verpackt und im Kühlschrank gelagert, da der Fluoreszenzfarbstoff sehr empfindlich auf Licht reagiert. Die Fotos wurden am nächsten Tag in einem abgedunkelten Laborraum gefertigt.

Tabelle 6: Verwendete Konzentrationen beim Annexin-V-Fluorescein/Propidiumiodid-Assay

HCKp/ HCKi Benzalkoniumchlorid	Kontrolle	Negativ(Leer)- Kontrolle	40 $\mu\text{g/ml}$	0,4 $\mu\text{g/ml}$	0,2 $\mu\text{g/ml}$	0,1 $\mu\text{g/ml}$
HCKp Cetrimid	Kontrolle	Negativ(Leer)- Kontrolle	100 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	0,1 $\mu\text{g/ml}$	0,01 $\mu\text{g/ml}$
HCKi Cetrimid	Kontrolle	Negativ(Leer)- Kontrolle	100 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	0,1 $\mu\text{g/ml}$	

3.7 Statistische Auswertung

Alle statistischen Auswertungen und Graphiken wurden mit dem Statistik-Programm SPSS15 angefertigt. P-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

Zur statistischen Auswertung der Gesamtzellzahl, der Vital-Zellzahl, des Vitalitätsanteils und der Vitalität wurde der independent T-Test verwendet. Zur Auswertung des Verhältnisses der Gesamtzellen und der Vitalzellen wurde der One-Sample-T-Test angewendet. Die Auswertung der Verdopplungszeit erfolgte mit dem Oneway ANOVA - Test.

4. ERGEBNISSE

4.1 Auswertung des Proliferationsassays für den Wirkstoff Benzalkoniumchlorid (BAC)

Primäre und immortalisierte Keratozyten wurden in Kultur auf ihr Proliferationsverhalten hin untersucht. N betrug bei den primären Zellen für alle Konzentrationen gleich 10. Für die immortalisierten Keratozyten betrug n=10 für die Kontrolle und 0,4µg/ml BAC; für die restlichen Konzentrationen n=5.

4.1.1 Morphologische Auswertung der mit BAC behandelten Zellkulturen

Deutlich erkennbar ist die Focusbildung der immortalisierten Zellen (Abb.6 A) im Gegensatz zur dendritischen Morphologie der primären Keratozyten (Abb.5 A,B) in den Kontrollkulturen.

Sowohl bei den primären als auch bei den immortalisierten Keratozyten sieht man in den Konzentrationen 40µg/ml und 4µg/ml Benzalkoniumchlorid nur noch avitale Zellreste und vom Boden gelöste Zellen (Abb.5C/D, Abb.6B/C) mit teilweiser Clusterbildung (Abb.5C, Abb.6C). Insbesondere bei der hohen Konzentration 40µg/ml scheinen die Zellen in beiden Zellreihen größtenteils an der Bodenfläche der Kulturschalen fixiert zu sein, da durch die sofortige toxische Wirkung von BAC ein langsames und sanftes Ablösen der Zellen vom Untergrund nicht möglich war. Ab der Konzentration 0,4µg/ml ist bei beiden Zellreihen ein deutlicher Anstieg der vitalen Zellen mikroskopisch auf Kontrollzellzahl-Niveau zu verzeichnen (Abb.5E/F/G, Abb.6D/E/F), allerdings in den Konzentrationen 0,4µg/ml und 0,2µg/ml noch mit vereinzelt vom Boden gelösten Zellen.

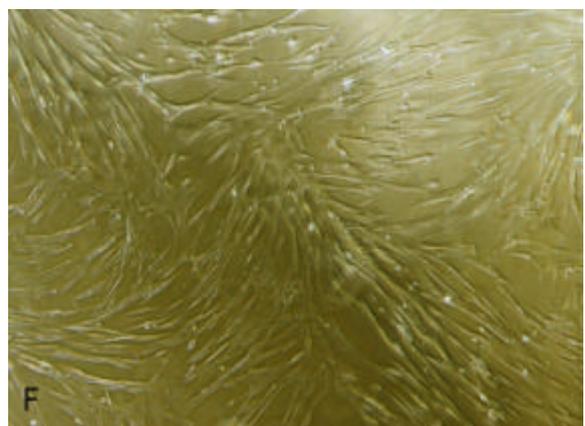
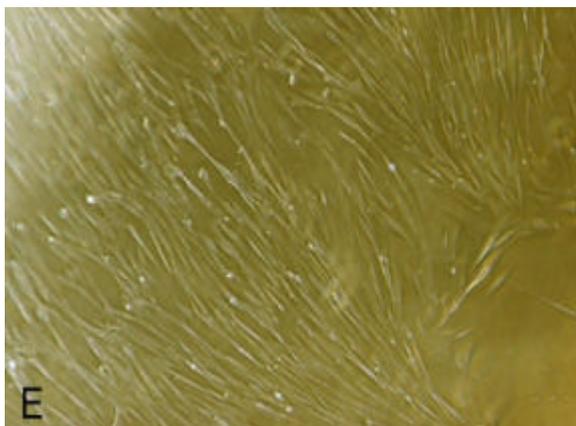
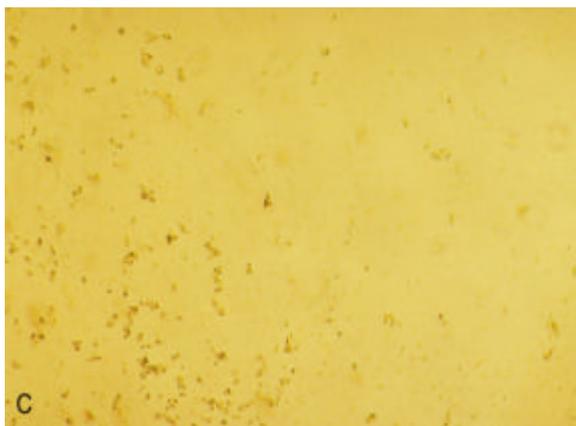
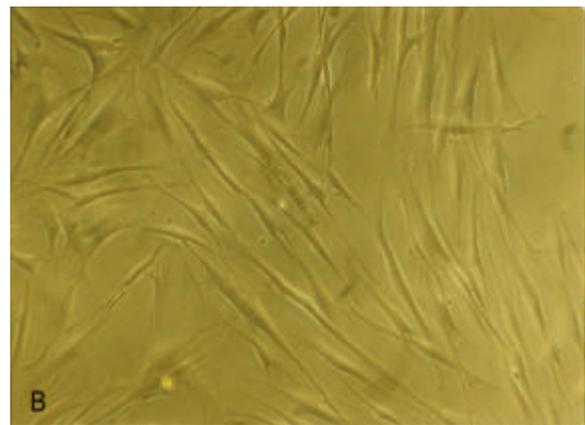
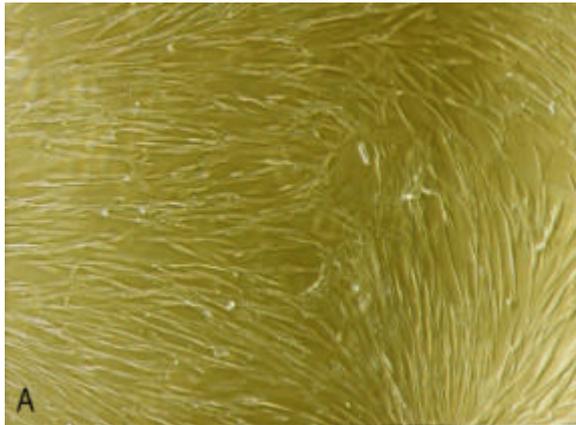


Abbildung 5: Primäre Keratozyten (HCKp) nach 72h Inkubation mit dem Wirkstoff Benzalkoniumchlorid (BAC) bei insgesamt 96h Kulturdauer. Lichtmikroskopisches Bild von Zellkulturen (angegeben ist immer die Originalvergrößerung auf Bildebene).

- A: HCKp Kontrolle x 50**
- B: HCKp Kontrolle x 100**
- C: HCKp 40µg/ml BAC x 50**
- D: HCKp 4µg/ml BAC x 50**
- E: HCKp 0,4µg/ml BAC x 50**
- F: HCKp 0,2µg/ml BAC x 50**
- G: HCKp 0,1µg/ml BAC x 50**

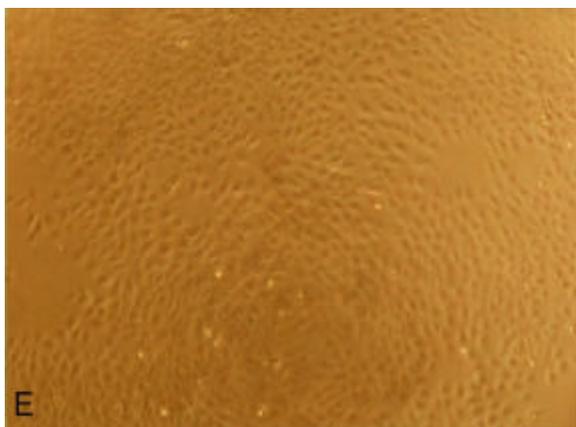
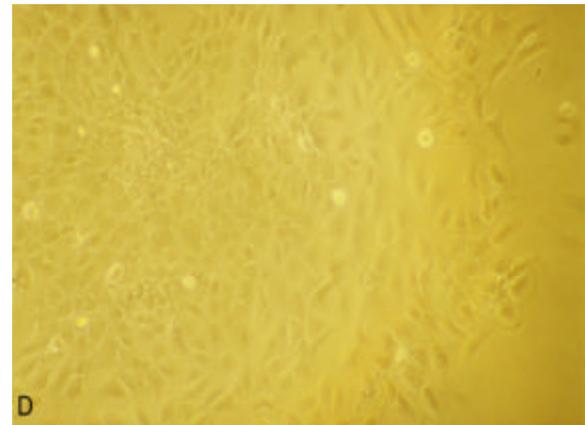
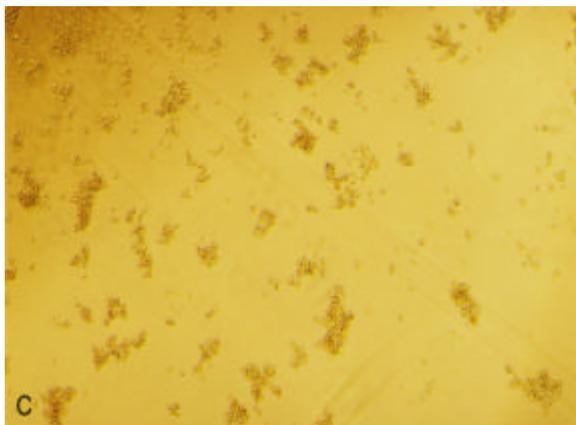
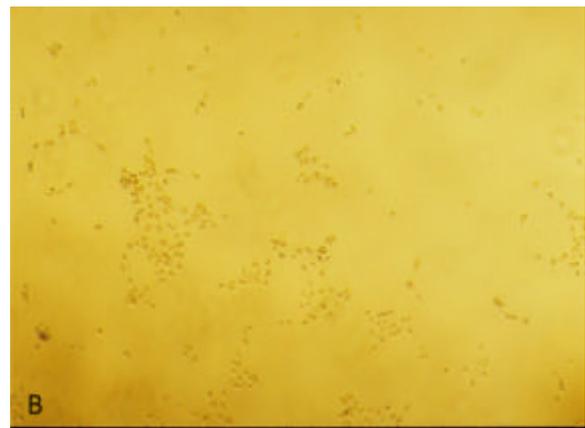


Abbildung 6: Immortalisierte Keratozyten (HCKi) nach 72h Inkubation mit dem Wirkstoff Benzalkoniumchlorid (BAC) bei insgesamt 96h Kulturdauer.

- A: HCKi Kontrolle x 50**
- B: HCKi 40µg/ml BAC x 50**
- C: HCKi 4µg/ml BAC x 50**
- D: HCKi 0,4µg/ml BAC x 100**
- E: HCKi 0,2µg/ml BAC x 50**
- F: HCKi 0,1µg/ml BAC x 50**

4.1.2 Auswertung der Verdopplungszeit

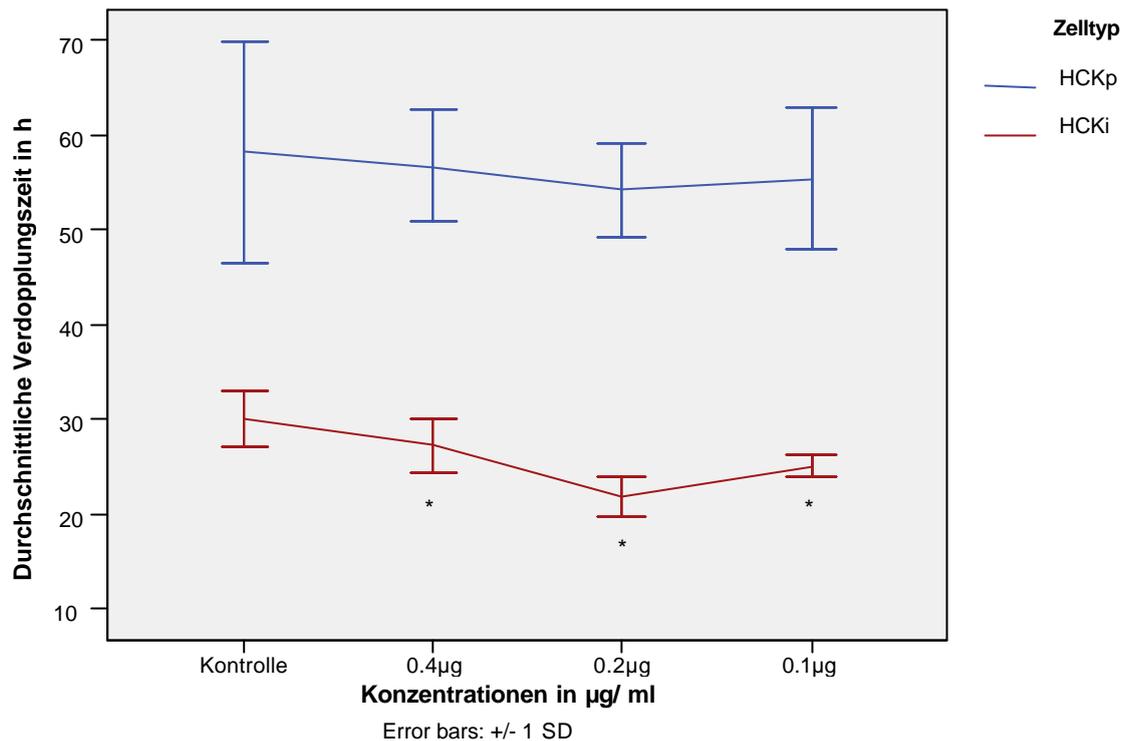
Die primären und immortalisierten Keratozyten wurden wie oben beschrieben über einen Zeitraum von 72h mit dem Konservierungsmittel Benzalkoniumchlorid (BAC) inkubiert, wobei die Zellen insgesamt über 96h in Kultur waren. Die Verdopplungszeit der Zellkultur wurde mit der ebenfalls oben beschriebenen Formel berechnet.

4.1.2.1 Auswertung der Verdopplungszeit bei mit BAC behandelten HCKp

Für die Kontrolle errechnete sich eine Verdopplungszeit von 58,23 Stunden mit einer Standardabweichung von +/- 11,62 Stunden. Alle mit der Kontrolle verglichenen Konzentrationen von Benzalkoniumchlorid ergaben keine statistische Signifikanz (ANOVA $p=0,702$).

Die mit 0,4 μ g/ml Benzalkoniumchlorid behandelte Vergleichsgruppe zeigte eine leichte Verkürzung der Verdopplungszeit um 2,56% auf 56,74 Stunden mit einer Standardabweichung von +/- 5,88 Stunden. Diese Differenz war statistisch nicht signifikant ($p = 0,676$). Die mit 0,2 μ g/ml BAC behandelte Vergleichsgruppe zeigte im Vergleich zu Kontrolle eine Verkürzung der Verdopplungszeit um 6,91% auf 54,20 Stunden mit einer Standardabweichung von +/- 4,96 Stunden ($p= 0,263$).

Eine 4,76%ige Verkürzung der Verdopplungszeit auf 55,46 Stunden im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich bei der mit 0,1 μ g/ml BAC behandelten Vergleichsgruppe ($p= 0,439$). (Gaphik 1)



Graphik 1: Durchschnittliche Verdopplungszeit in Stunden bei mit BAC behandelten primären (HCKp) und immortalisierten (HCKi) Keratozyten. Die Inkubationsdauer mit Benzalkoniumchlorid betrug 72 Stunden bei insgesamt 96 stündiger Kulturdauer. n=10 für alle Konzentrationen. *= Signifikanz bei HCKi $p < 0,05$.

4.1.2.2 Auswertung der Verdopplungszeit bei mit BAC behandelten HCKi

Bei der Kontrolle zeigte sich eine Verdopplungszeit von 30,03 Stunden bei einer Standardabweichung von +/- 2,99 Stunden (siehe Graphik 1). Im Vergleich zur Kontrolle errechnete sich für alle Vergleichsgruppen eine signifikante Verkürzung der Verdopplungszeit (ANOVA $p = < 0,0001$).

Bei der mit BAC 0,4 µg/ml behandelten Vergleichsgruppe verkürzte sich im Vergleich zur Kontrolle die Zeit signifikant um 9,48% auf 27,18 Stunden ($p = 0,022$) mit einer Standardabweichung von +/- 2,86 Stunden.

Die mit 0,2 µg/ml BAC behandelte Gruppe zeigte im Vergleich zu Kontrolle eine signifikante Verkürzung der Verdopplungszeit um 27,56% auf 21,75 Stunden ($p = < 0,0001$). Die Standardabweichung betrug +/- 2,04 Stunden.

Die mit 0,1 µg/ml BAC behandelte Vergleichsgruppe zeigte im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls eine signifikante Verkürzung der Verdopplungszeit um 16,56% auf 24,99 Stunden +/- 1,17 Stunden Standardabweichung ($p = 0,002$).

4.1.3 Auswertung der Proliferationsergebnisse der mit BAC behandelten Zellkulturen

In diesem Versuchsansatz wurde untersucht, wie HCKp auf den Wirkstoff BAC reagierten. Dafür wurden die Zellen mit den Konzentrationen 40µg/ml, 4µg/ml, 0,4µg/ml, 0,2µg/ml und 0,1µg/ml über einen Zeitraum von 72 Stunden inkubiert. Die Kontrolle, sowie auch die restlichen Konzentrationen befanden sich insgesamt über 96 Stunden in Kultur. Da der Zellcounter für die Konzentrationen 40µg/ml und 4µg/ml keine validen Werte liefern konnte, wurden diese gleich Null gesetzt, da klinisch bzw. unter dem Lichtmikroskop keine vitalen Zellen mehr nachgewiesen werden konnten (siehe Abb. 5C/D, 6B/C). Aus diesem Grund wurden diese Konzentrationen aus der statistischen Wertung herausgenommen. Alle restlichen Konzentrationen wurden mit der jeweiligen Kontrolle verglichen. Untersucht wurden die Gesamtzellzahl als auch die Zellzahl der vitalen, also lebenden, Zellen.

4.1.3.1 Auswertung der Proliferationsergebnisse bei primären Keratozyten

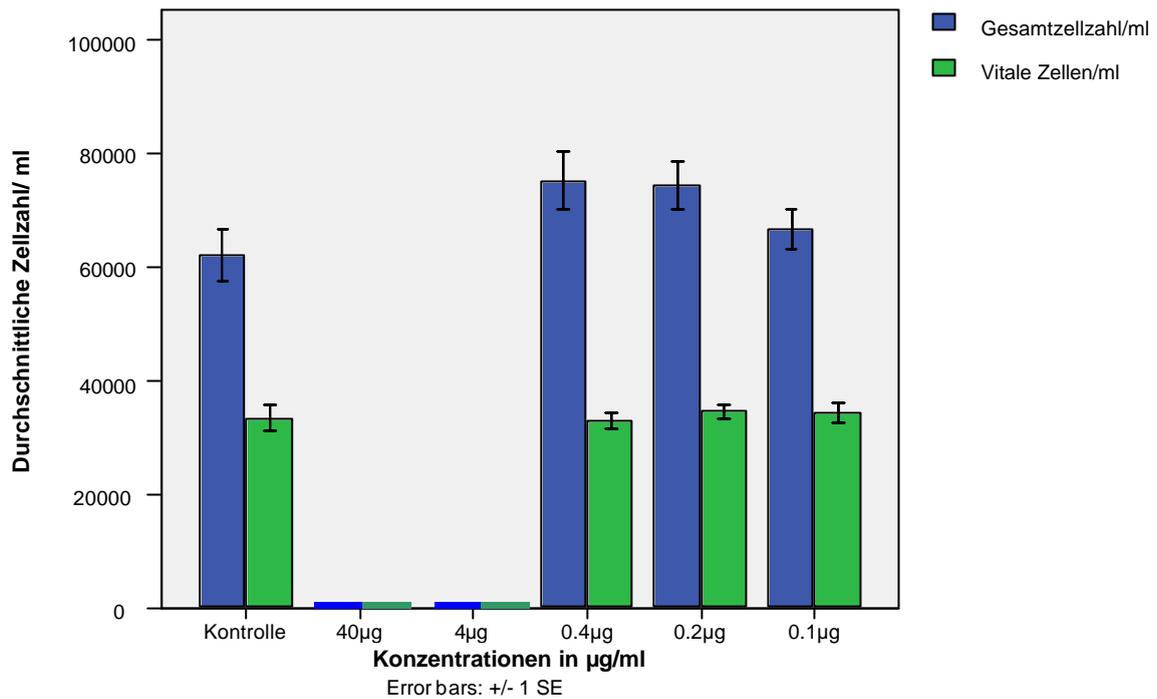
Die Kontrolle erreichte eine durchschnittliche Gesamtzellzahl von 62113 Keratozyten +/- 4714,34 Standardfehler. Der Anteil an vitalen Zellen lag dabei durchschnittlich bei 33379 +/- 2329,55 Keratozyten.

Sowohl innerhalb der Gruppe der gesamten Zellen als auch innerhalb der vitalen Zellen konnte keine statistische Signifikanz im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle nachgewiesen werden.

Insgesamt wurde die Kontrollzellzahl ab der BAC-Konzentration 0,4µg/ml sowohl in der Gesamtzellzahl-Gruppe mit einem durchschnittlichen Wert von 75258 Zellen ($p= 0,073$), als auch in der Gruppe der vitalen Zellen mit einem durchschnittlichen Wert von 32897 Zellen ($p= 0,859$) erreicht (Graphik 2). Der Standardfehler betrug bei der Gruppe der Gesamtzellzahl +/- 5051,84 Zellen, bei der Gruppe der vitalen Zellen +/- 1274,96 Zellen.

Bei der Konzentration 0,2µg/ml zeigte sich keine statistische Signifikanz bei einem p-Wert von 0,065 für die Gesamtzellzahl und einem p-Wert von 0,643 für die vitalen Zellen. Die durchschnittliche Zellzahl betrug bei der Gruppe der gesamten Zellzahl 74299 +/- 4039,68. Die Gruppe der vitalen Zellen erreichte einen durchschnittlichen Wert von 34616 +/- 1171,93.

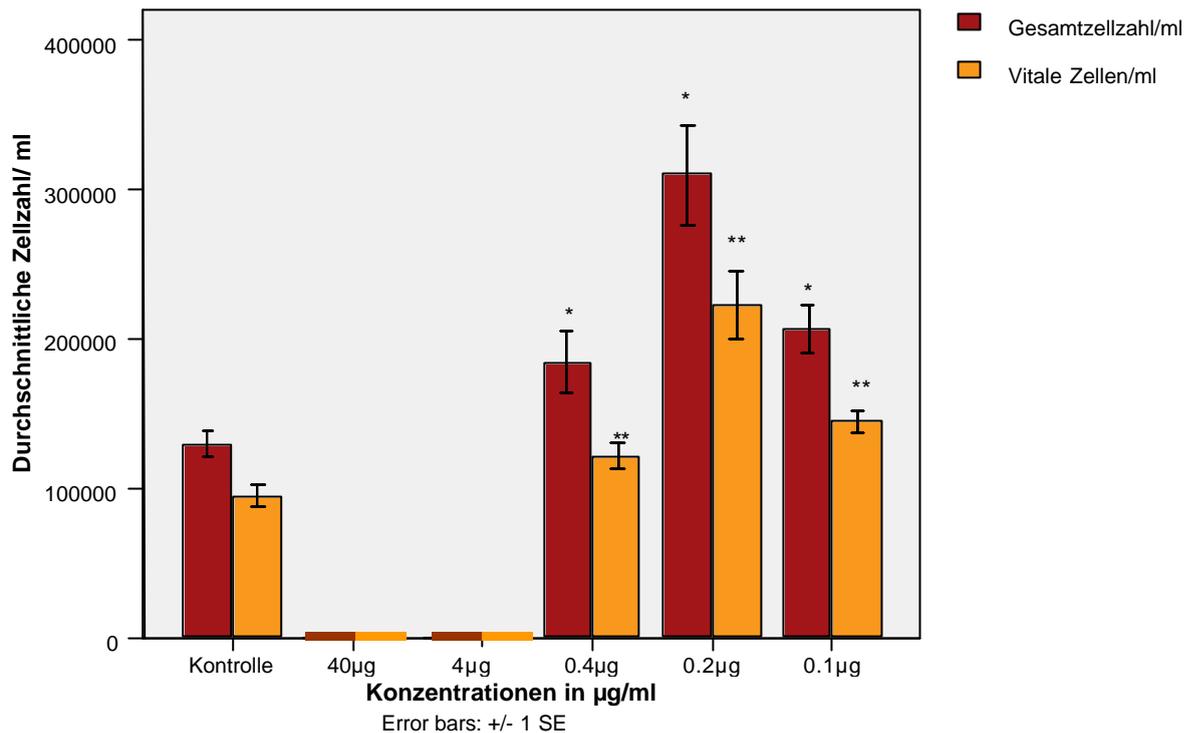
Auch die Konzentration 0,1µg/ml BAC zeigte in der Gruppe der Gesamtzellzahl mit einem p-Wert von 0,451 und in der Gruppe der vitalen Zellen mit einem p-Wert von 0,747 keine statistische Signifikanz.



Graphik 2: Durchschnittliche Zellzahl der gesamten und vitalen primären Keratozyten, die mit Benzalkoniumchlorid behandelt wurden. Die Konzentrationen 40µg/ml und 4µg/ml wurden gleich Null gesetzt.

4.1.3.2 Auswertung der Proliferationsergebnisse bei immortalisierten Keratozyten

Die Kontrolle erreichte eine durchschnittliche Gesamtzellzahl von 129840 +/- 8067,96 Standardfehler und eine Vital-Zellzahl von 95801 +/- 7258,48 Zellen. In allen Vergleichsgruppen konnte ab der Benzalkonium-Konzentration 0,4µg/ml ein signifikanter Anstieg der gesamten Keratozyten ($p= 0,031$) auf 184490 +/- 20705,66 und der vitalen Zellen ($p= 0,041$) auf 121760 +/- 9290,45 im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle gesehen werden. Dieser signifikante Anstieg setzte sich auch in der folgenden Konzentration deutlich fort. Die Zellzahl stieg im Vergleich zur Kontrolle um mehr als das Doppelte sowohl bei den gesamten ($p= 0,005$) als auch den vitalen Zellen ($p= <0,0001$) an (siehe Graphik 3). Dieser Anstieg ging bei der letzten untersuchten Konzentration von 0,1µg/ml zwar etwas wieder zurück, dennoch war der Anstieg im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle hochsignifikant. Für die Gesamtzellzahl betrug der p-Wert = $<0,0001$, für die vitalen Zellen $p = 0,001$.



Graphik 3: Durchschnittliche Zellzahl der gesamten und vitalen immortalisierten Keratozyten, die mit Benzalkoniumchlorid behandelt wurden. Die Konzentrationen 40µg/ml und 4µg/ml wurden gleich Null gesetzt. * = Signifikanter Unterschied zur Kontrolle in der Gruppe der Gesamtzellzahl. **=Signifikanter Unterschied in der Gruppe der Vital-Zellzahl.

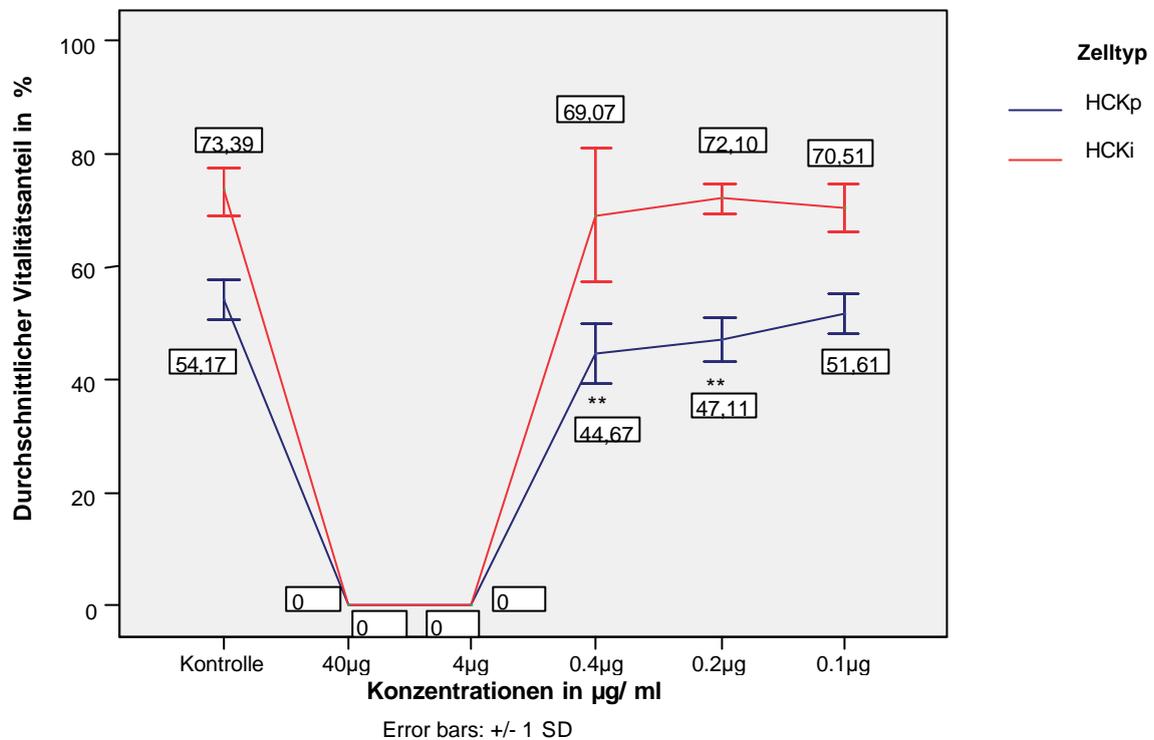
4.1.4. Auswertung des Vitalitätsanteils der mit BAC behandelten Zellkulturen

Der Vitalitätsanteil, also der Anteil von vitalen Zellen an der Gesamtzellzahl, kann als Marker für die Vitalität eingesetzt werden bzw. wird vom Zellcounter auch automatisch als Wert für die Vitalität in % angegeben. Wie auch schon bei der Auswertung der Proliferationsergebnisse wurden die ersten zwei Konzentrationen gleich Null gesetzt, da sie auf den selben Daten basieren, und aus der statistischen Auswertung herausgenommen.

4.1.4.1 Auswertung des Vitalitätsanteils der mit BAC behandelten HCKp

Die Kontrolle wies einen Anteil der vitalen Zellen von 54,17% +/- 3,67% Standardabweichung auf (siehe Graphik 4). In den Konzentrationen 0,4µg/ml und 0,2µg/ml Benzalkoniumchlorid konnte im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Senkung der Vitalität nachgewiesen werden. Für die Konzentration 0,4µg/ml betrug der p-Wert = <0,0001 und für die Konzentration 0,2µg/ml betrug er p= 0,001. Keine Signifikanz wurde bei der letzten Konzentration, also 0,1µg/ml, festgestellt (p= 0,128).

Insgesamt kann man also sagen, dass die Zellzahlen ab 0,4µg/ml Benzalkoniumchlorid zwar wieder der Kontrolle entsprachen, die Vitalität jedoch bis zu einer Konzentration von 0,1µg/ml signifikant herabgesetzt war.



Graphik 4: Anteil der vitalen Zellen an der Gesamtzellzahl in % für die mit Benzalkoniumchlorid behandelten Keratozyten. ** = Signifikanter Unterschied zur Kontrolle bei HCKp. ($p < 0,0001$ bzw. $0,001$)

4.1.4.2 Auswertung des Vitalitätsanteils der mit BAC behandelten HCKi

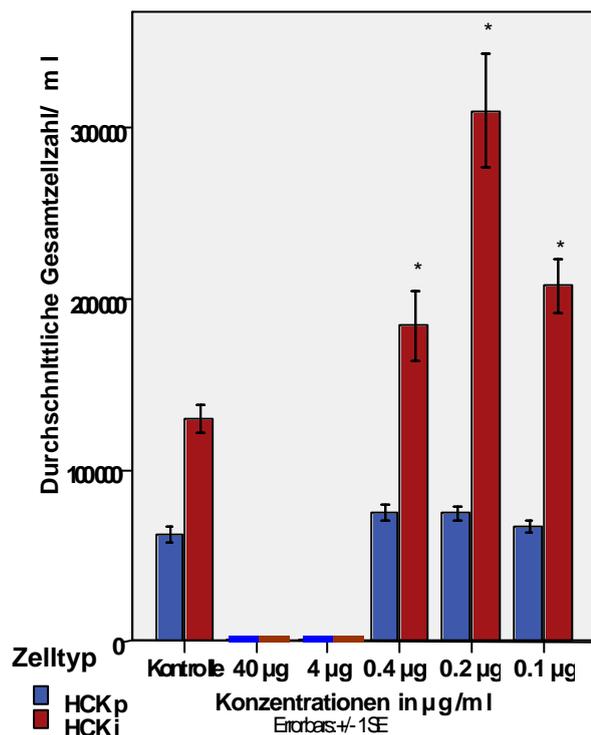
Die Kontrolle erreichte einen durchschnittlichen Vitalitätsanteil von 73,39% +/- 4,17%. In keiner der untersuchten Vergleichsgruppen konnte ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden. Es besteht also bereits ab einer Konzentration von 0,4µg/ml ($p=0,300$) bei den immortalisierten Keratozyten bei einem signifikantem Anstieg der Zellzahl keine Einschränkung der Vitalität mehr (siehe Graphik 4).

4.1.5 Vergleich der Ergebnisse zwischen primären und immortalisierten Keratozyten

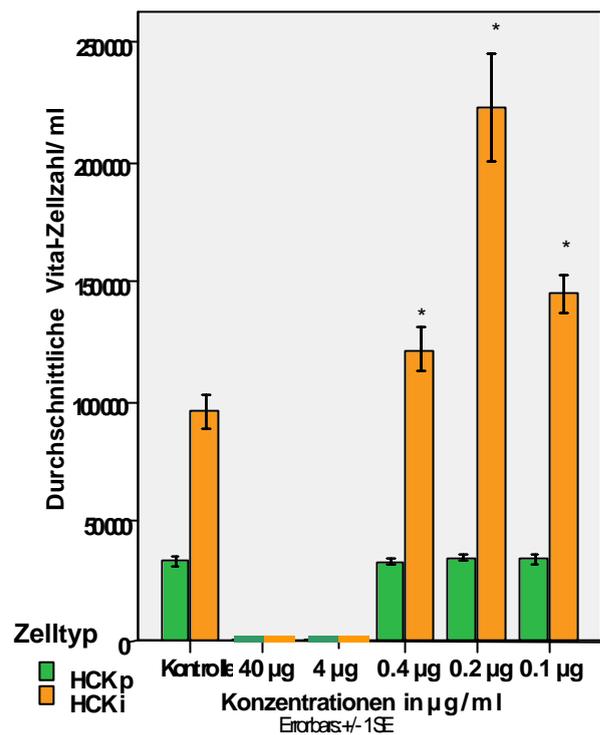
Bei dieser Auswertung der Proliferationsergebnisse ging es primär darum, Unterschiede bzw. eine mögliche Vergleichbarkeit zwischen den beiden Zelllinien aufzuzeigen. Von besonderem Interesse war, ob insbesondere die immortalisierten Keratozyten sich ähnlich unter Einwirkung einer toxischen Substanz verhalten und ob diese auch geringe, den primären Keratozyten

entsprechende, Schädigungsraten aufzeigen können. Hierbei ging es weniger um absolute Zahlen, als vielmehr um die Vergleichbarkeit beider Zelllinien und eine ggf. gleiche Tendenz der Ergebnisse.

Um die in den Vorversuchen sowie auch aus den Graphiken 5 und 6 ersichtlichen signifikanten Unterschiede der erreichten bzw. der Ausgangs-Zellzahl vergleichen zu können, wurden die Proliferationsergebnisse sowie die Ergebnisse der Vitalitätsbestimmung in der jeweiligen Kontrolle gleich 100% gesetzt.



Graphik 5: Durchschnittliche Gesamtzellzahl/ml von mit Benzalkoniumchlorid behandelten primären und immortalisierten Keratozyten. *=Signifikanter Unterschied zur Kontrolle bei HCKi.



Graphik 6: Durchschnittliche Vital-Zellzahl/ml von mit Benzalkoniumchlorid behandelten primären und immortalisierten Keratozyten. *=Signifikanter Unterschied zur Kontrolle bei HCKi.

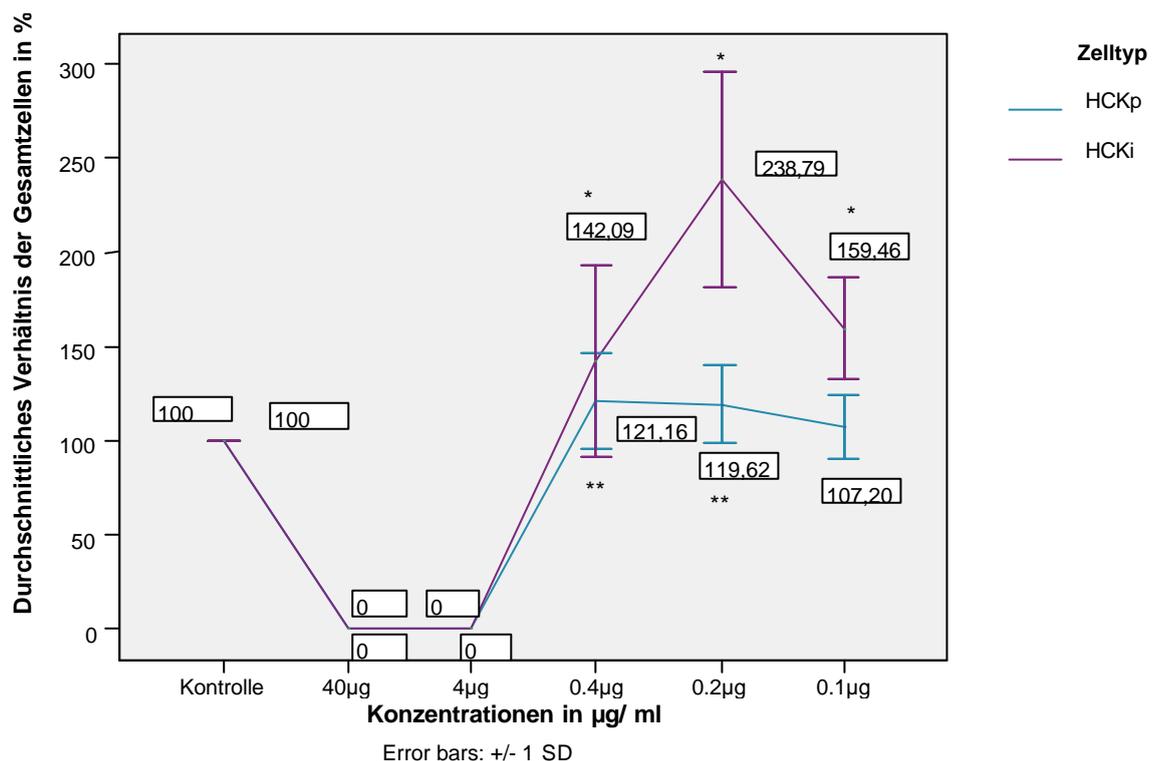
4.1.5.1 Vergleich der mit BAC behandelten HCKp und HCKi

Die primären Keratozyten zeigten in ihrer Gesamtzellzahl in den Konzentrationen 0,4µg/ml ($p=0,029$) und 0,2µg/ml ($p=0,015$) einen signifikanten Anstieg (Graphik 7). Auffällig war, dass den höchsten Anstieg auf 121,16% +/- 25,71% Standardabweichung die Konzentration 0,4µg/ml aufzeigte. Bei der geringsten untersuchten Konzentration (0,1µg/ml) konnte zur Kontrolle keine statistische Signifikanz mehr nachgewiesen werden ($p=0,218$).

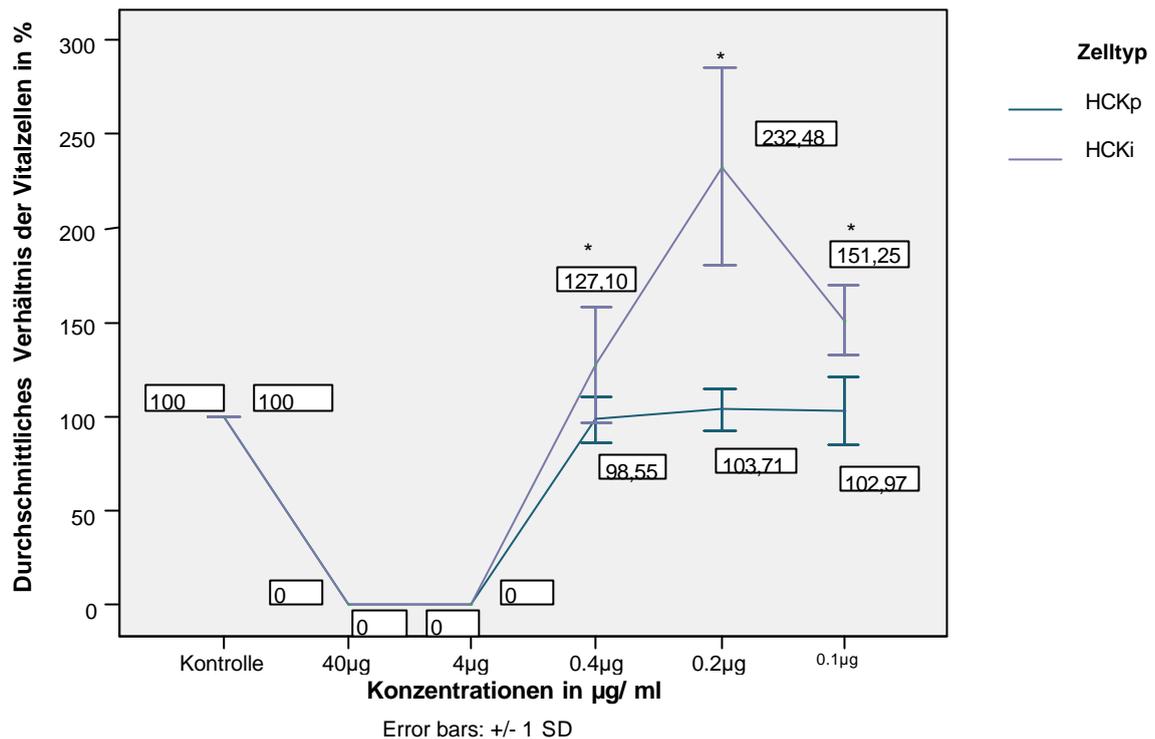
Die immortalisierten Keratozyten zeigten jedoch in allen mit der Kontrolle verglichenen Konzentrationen einen hochsignifikanten Anstieg der Gesamtzellzahl auf bis zu 238,78% bei 0,2µg/ml (p=0,006). Bereits die Konzentration 0,4µg/ml hatte einen signifikanten p-Wert von 0,027. Auch die geringste Konzentration 0,1µg/ml wies im Gegensatz zu den HCKp einen signifikanten p-Wert von 0,008 im statistischen Vergleich mit der Kontrolle auf.

In der Gruppe der vitalen primären Keratozyten konnte bei keiner Benzalkoniumchlorid-Konzentration ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle nachgewiesen werden (Graphik 8).

Die vitalen immortalisierten Keratozyten wiesen im Gegensatz hierzu jedoch in allen Konzentrationen eine signifikant höhere Zellzahl auf. Insbesondere in der Konzentration 0,2 µg/ml hatte sich die Zellzahl mit einem Wert von 232,48% mehr als verdoppelt (p=0,005). Aber auch bereits bei einer Konzentration von 0,4µg/ml war die Vital-Zellzahl deutlich höher als die der Kontrolle (p= 0,021). Selbst die geringste BAC-Konzentration wies noch eine signifikanten Anstieg im Vergleich zur Kontrolle auf (p= 0,004).



Graphik 7: Durchschnittliche Gesamtzellzahl der mit Benzalkoniumchlorid behandelten primären und immortalisierten Keratozyten. **= Signifikanz der primären Keratozyten (HCKp) p= <0,05. *=Signifikanz der immortalisierten Keratozyten (HCKi) p= <0,05.

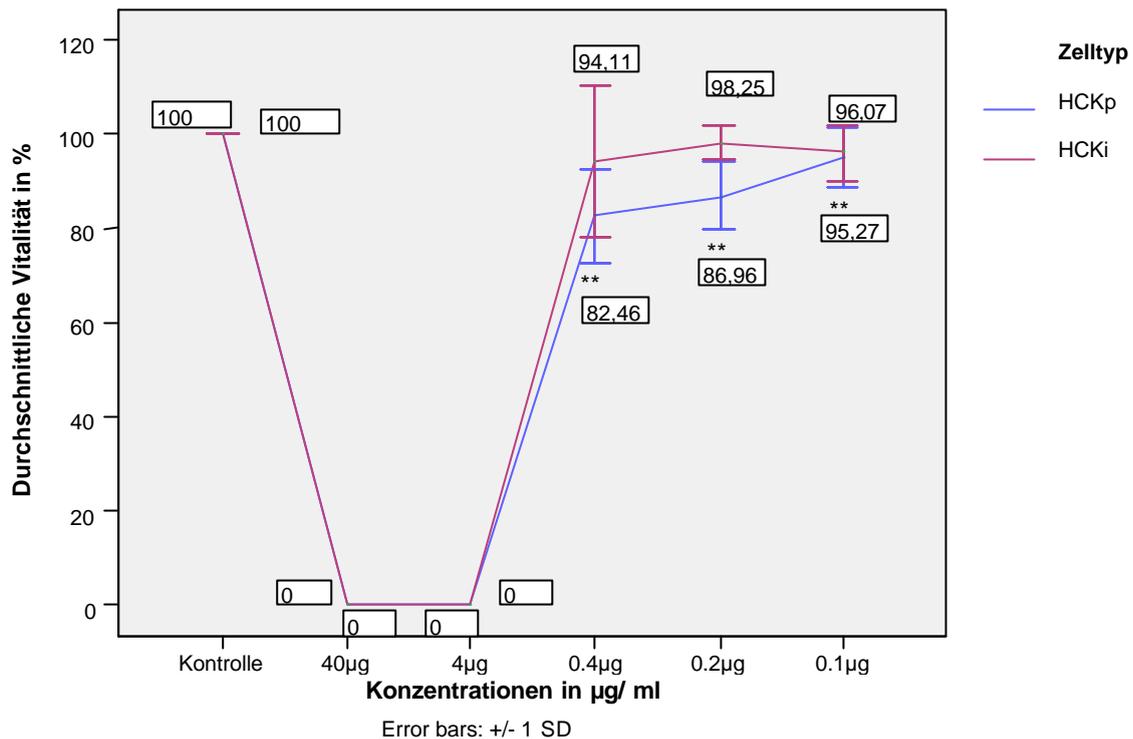


Graphik 8: Durchschnittliche Vital-Zellzahl der mit Benzalkoniumchlorid behandelten primären und immortalisierten Keratozyten. *=Signifikanz der immortalisierten Keratozyten (HCKi) $p < 0,05$.

4.1.5.2 Vergleich der Vitalität zwischen mit BAC behandelten HCKp und HCKi

Die Vitalität ist in der Gruppe der primären Keratozyten bei allen verglichenen Konzentrationen signifikant herabgesetzt (Graphik 9). Für die Konzentrationen 0,4µg/ml und 0,2µg/ml errechneten sich p-Werte von $< 0,0001$. Die letzte Konzentration 0,1µg/ml war noch leicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle herabgesetzt ($p = 0,047$).

In der Gruppe der immortalisierten Keratozyten allerdings wurde kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle nachgewiesen.



Graphik 9: Durchschnittliche Vitalität in % der mit Benzalkoniumchlorid behandelten primären und immortalisierten Keratozyten. **= Signifikanz für primäre Keratozyten (HCKp); für die Konzentrationen 0,4µg/ml und 0,2µg/ml $p < 0,0001$; für die Konzentration 0,1µg/ml $p < 0,05$.

4.2 Ergebnisse des TUNEL-Assays (BAC)

Man erkennt deutlich die oben beschriebenen morphologischen Unterschiede zwischen den beiden Zellreihen, sowohl in der Anzahl der im Gesichtsfeld vorhandenen Zellkerne als auch in der Ausrichtung ihres Zytoskeletts. In der Gruppe der mit 40µg/ml BAC behandelten Keratozyten sieht man in beiden Zellreihen eine Nekrose und Fixierung der noch vorhandenen Zellen. Es waren keine vitale Zellen mehr vorhanden (Abb. 7/8 B). Ab der Konzentration 0,4µg/ml steigt die Anzahl der vitalen Zellen sprunghaft in beiden Zellreihen an, vor allem aber bei den HCKi. Aufgrund der nur vereinzelt vorkommenden Apoptosen, die der Kontrollgruppe entsprechen, wurde von einer quantitativen Analyse abgesehen. Im Verlauf der restlichen Konzentrationen steigt die Zellzahl bei den HCKp pro Gesichtsfeld weiter an, Apoptosen waren nicht vorhanden (Abb. 7 D/E). Bei den immortalisierten Zellen erkennt man in der Abbildung 8C zwei Apoptosen, die mit einem Pfeil gekennzeichnet sind. Im oberen Bereich des Bildes erkennt man eine Chromatinverdichtung und -verlagerung entlang des Zellrandes, im mittleren Bildbereich eine Zelle in der Blebbing-Phase. Bei den restlichen Konzentrationen wurden bei den HCKi keine Apoptosen detektiert. Im rechten Bereich der Abbildung 8E (0,1µg/ml) ist eine

Mitose sichtbar (dunkler Pfeil), im linken Bildbereich dagegen eine trotz der geringen Konzentration morphologisch noch veränderte Zelle (schmaler Pfeil).

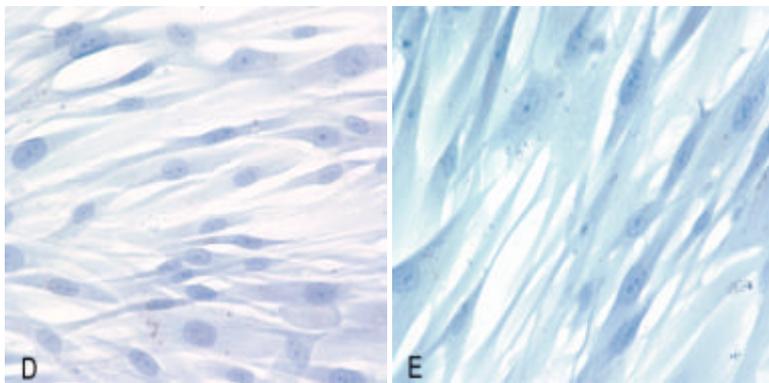
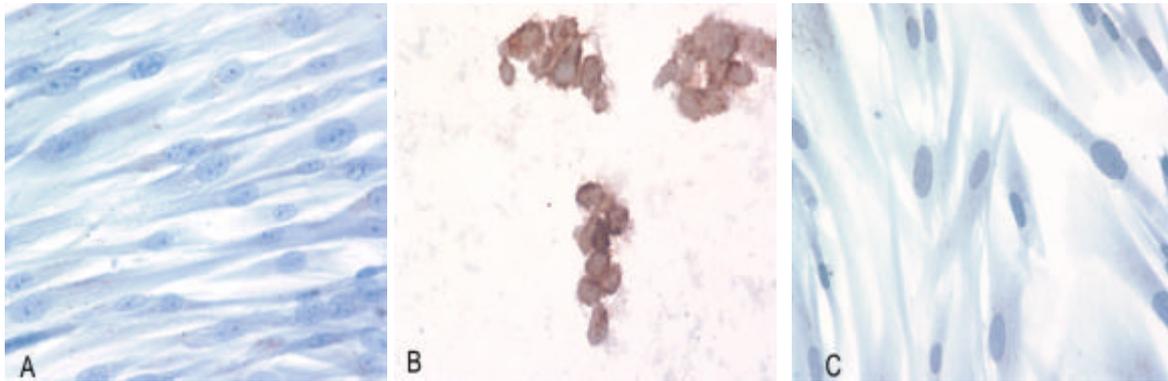


Abbildung 7: TUNEL-Färbung der mit Benzalkoniumchlorid behandelten primären Keratozyten.
 Vergrößerung x 400 (auf Originalbildebene)
 A: Kontrolle B: 40µg/ml
 C: 0,4µg/ml D: 0,2µg/ml
 E: 0,1µg/ml

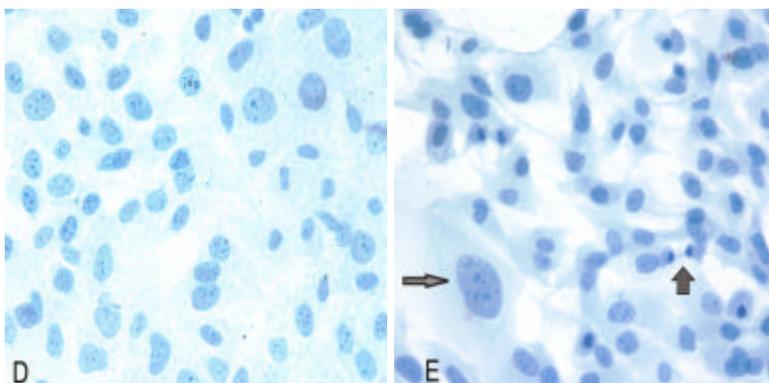
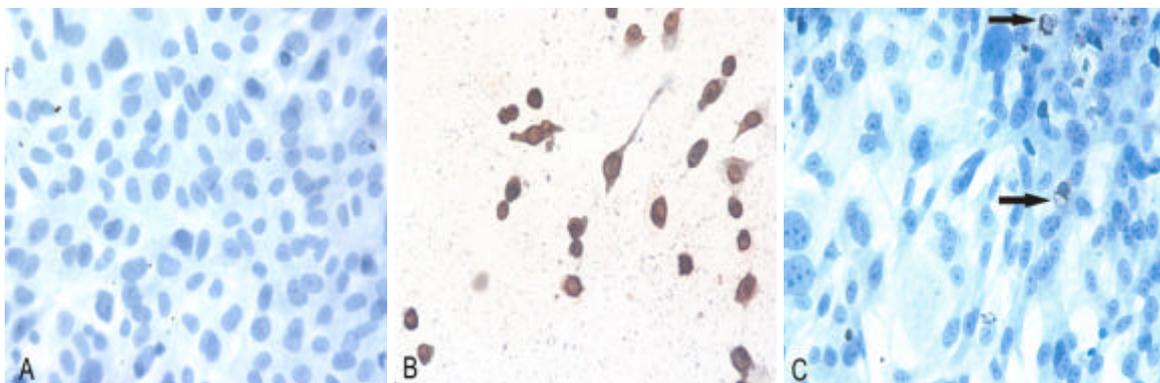


Abbildung 8: TUNEL-Färbung der mit Benzalkoniumchlorid behandelten immortalisierten Keratozyten.
 Vergrößerung x 400 (auf Originalbildebene)
 A: Kontrolle B: 40µg/ml
 C: 0,4µg/ml D: 0,2µg/ml
 E: 0,1µg/ml

4.3 Ergebnisse des Annexin-V-Fluorescein/Propidiumiodid-Assays (BAC)

Außer bei der Konzentration 40µg/ml wurden weder in der Gruppe der HCKp noch in der Gruppe der HCKi nekrotische oder apoptotische Veränderungen festgestellt. Bei den Kontrollen der HCKp und HCKi wurde weder eine Annexin-V- noch eine Propidiumiodid-Anfärbung detektiert (Abb.9,10 B/C). Bei der Konzentration 40µg/ml ist eine deutliche toxische Schädigung der Zellen mit nachfolgender Nekrose zu sehen. Insbesondere bei den HCKp sind nur noch vereinzelt Riesenzellen erkennbar (Abb. 9 D/E/F). Deutlich sieht man auch in der Gruppe der HCKi die Anfärbung der Zellen sowohl mit Annexin-V-Fluorescein als auch mit Propidiumiodid, was für eine nekrotische Schädigung der Zellen spricht (Abb.10 D/E/F).

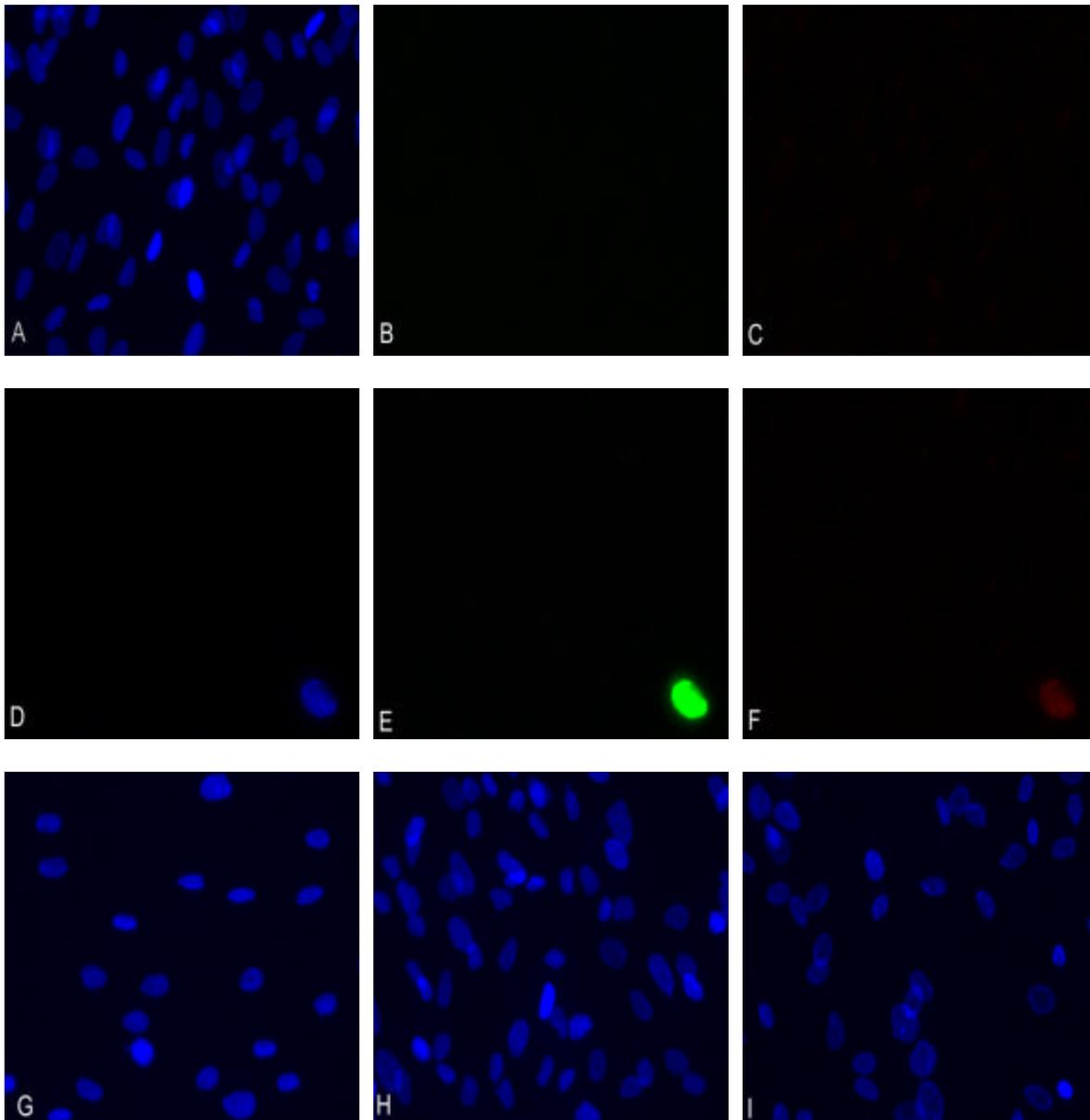


Abb. 9: Fluoreszenzfärbung der mit BAC behandelten HCKp. Vergrößerung x 400 (auf Originalbildebene). A: Kontrolle HCKp DAPI B: Kontrolle HCKp Annexin-V C: Kontrolle HCKp Propidiumiodid D: 40µg/ml DAPI E: 40µg/ml Annexin-V F: 40µg/ml Propidiumiodid, DAPI= G: 0,4µg/ml H: 0,2µg/ml I: 0,1µg/ml

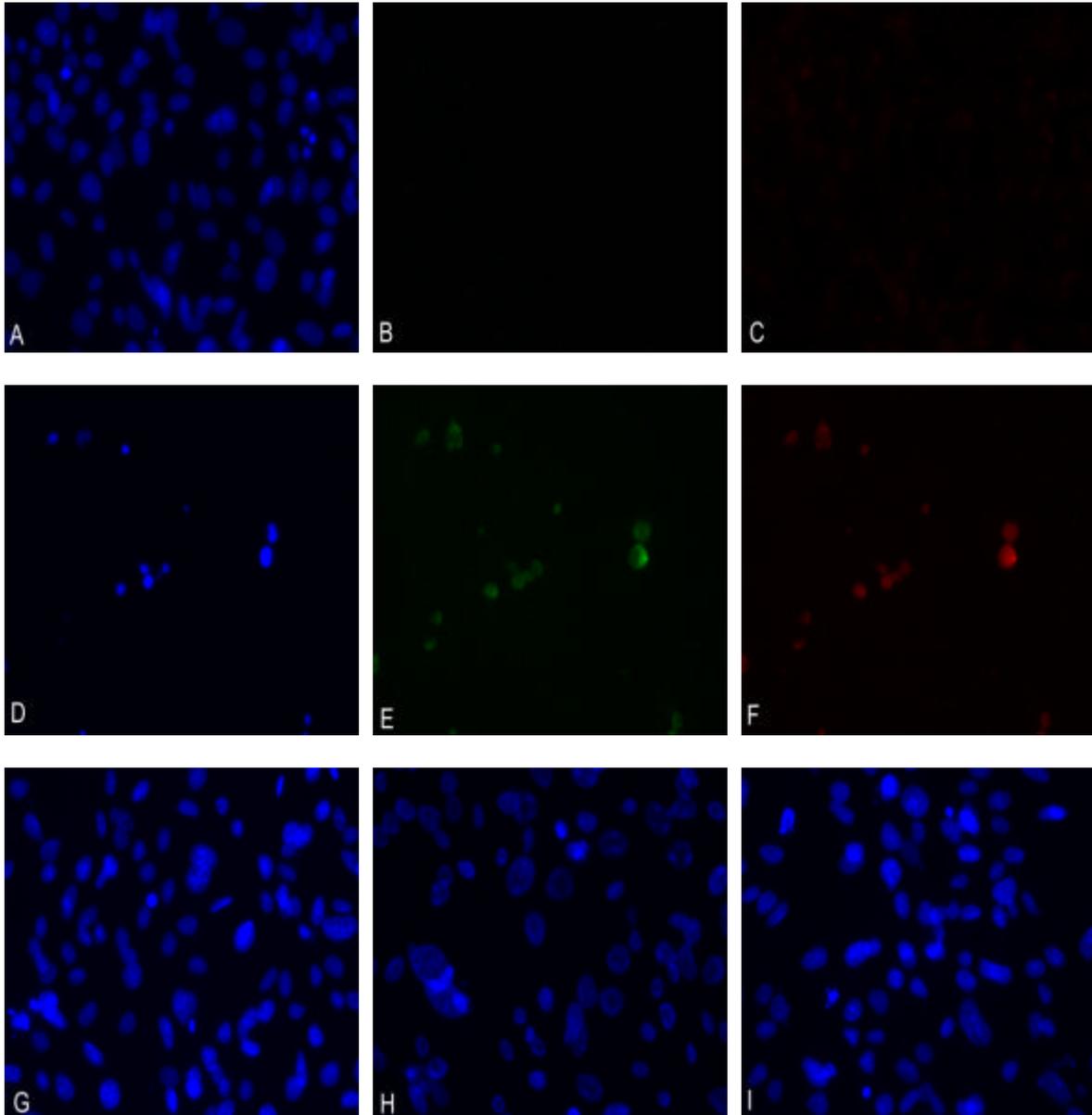


Abbildung 10: Fluoreszenzfärbung der mit Benzalkoniumchlorid behandelten immortalisierten Keratozyten. Vergrößerung x 400 (Vergrößerung auf Originalbildebene).

- A: Kontrolle HCKi DAPI**
- B: Kontrolle HCKi Annexin-V-Färbung**
- C: Kontrolle HCKi Propidiumiodid-Färbung**
- D: 40µg/ml HCKi DAPI**
- E: 40µg/ml HCKi Annexin-V-Färbung**
- F: 40µg/ml HCKi Propidiumiodid-Färbung**
- G: 0,4µg/ml HCKi DAPI**
- H: 0,2µg/ml HCKi DAPI**
- I: 0,1µg/ml HCKi DAPI**

4.4 Auswertung des Proliferationsassays für den Wirkstoff Cetrimid

Primäre und immortalisierte Keratozyten wurden auf ihr Proliferationsverhalten hin untersucht. N betrug bei den primären Zellen für die Konzentration 0,1µg/ml gleich 11, für alle restlichen Konzentrationen war n=10. Für die immortalisierten Keratozyten betrug n=12 für die Kontrolle, n=11 für die Konzentration 1µg/ml und n=10 für die Konzentration 0,1µg/ml.

4.4.1 Morphologische Auswertung der mit Cetrimid behandelten Zellkulturen

In Abbildung 11 und 12 A erkennt man die unterschiedliche Morphologie der immortalisierten Zellen, die zu einer Focusbildung im Gegensatz zur dendritischen Morphologie der primären Zellen neigen. Ein deutlicher Verlust und Absterben der Zellen ist in den Konzentrationen 100µg/ml und 10µg/ml erkennbar (Abb.11 und 12 B/C). Auffällig ist die Fixierung der Zellreste auf dem Schalen-Untergrund in der Konzentration 100µg/ml in beiden Zellreihen (Abb.11, 12 B). Dies ist Ausdruck einer starken und vor allem schnellen bzw. sofortigen toxischen Schädigung der Zellen ohne Möglichkeit einer schonenden Ablösung vom Untergrund. Bei der Konzentration 10µg/ml dominieren dann jedoch die vom Boden gelösten Zellen, die zumeist in Clustern auf dem Medium schwimmen (Abb.11, 12 C).

Ab der Konzentration 1µg/ml (Abb.11, 12 D) ist ein deutlicher Anstieg der vitalen Zellen zu verzeichnen. Insbesondere bei den immortalisierten Zellen ist die Ausbreitung der vom Boden gelösten Zellen noch verhältnismäßig sehr hoch. Die Zellzahl steigt im Verlauf dann deutlich an, so dass bei den primären Zellen ab der Konzentration 0,01µg/ml (Abb.11 F) und bei den immortalisierten Keratozyten ab einer Konzentration von 0,1µg/ml (Abb.12 F) mikroskopisch ein Kontroll-Niveau wieder erreicht wird.

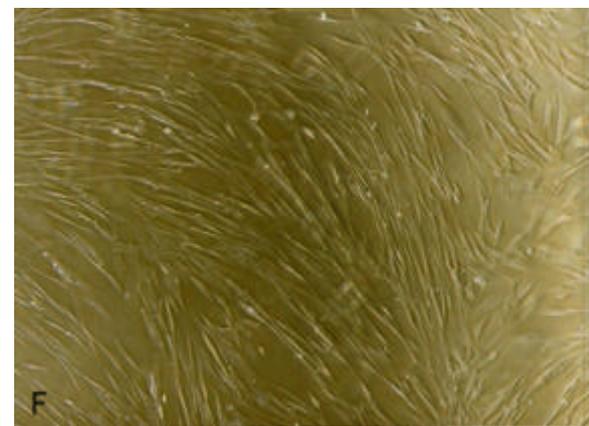
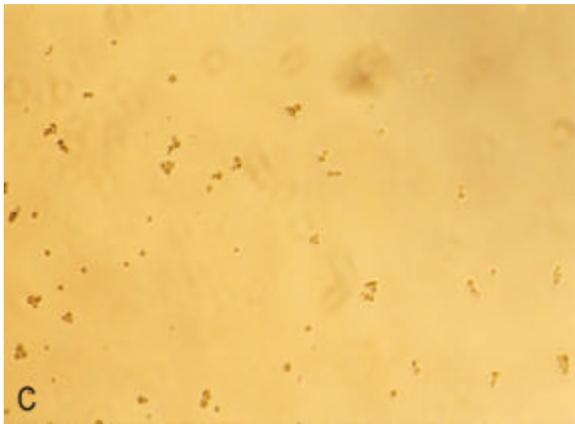
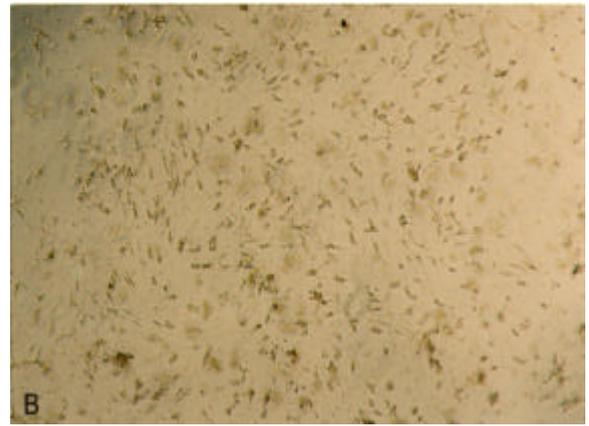
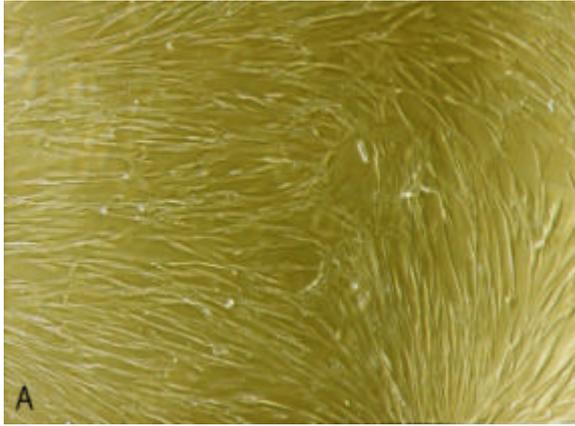


Abbildung 11: Primäre Keratozyten (HCKp) nach 72h Inkubation mit dem Wirkstoff Cetrimid bei insgesamt 96h Kulturdauer. Lichtmikroskopisches Bild von Zellkulturen, Vergrößerung x 50 (Originalvergrößerung auf Bildebene).

**A: HCKp Kontrolle B: HCKp 100µg/ml Cetrimid C: HCKp 10µg/ml Cetrimid
D: HCKp 1µg/ml Cetrimid E: HCKp 0,1µg/ml Cetrimid F: HCKp 0,01µg/ml Cetrimid**

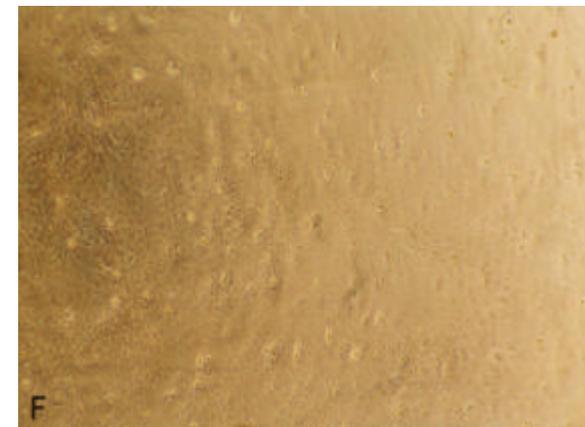
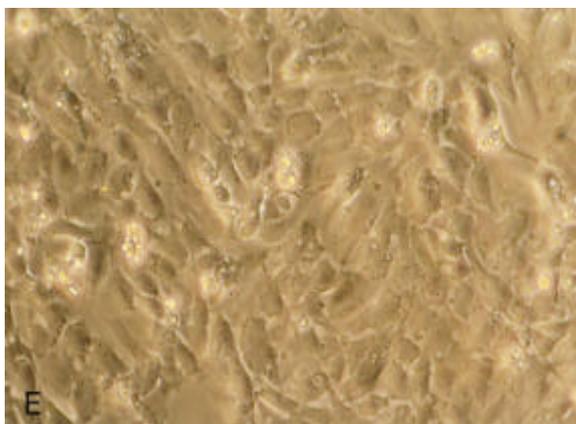
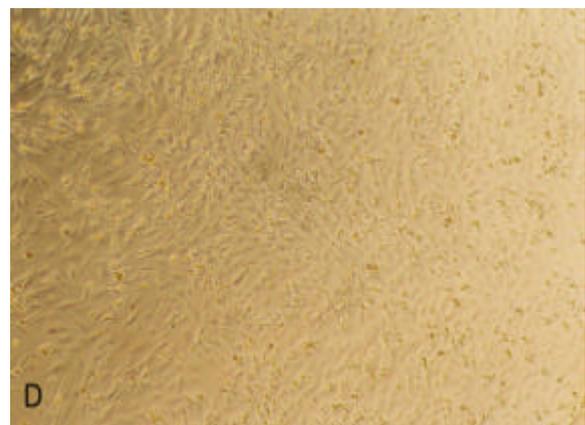
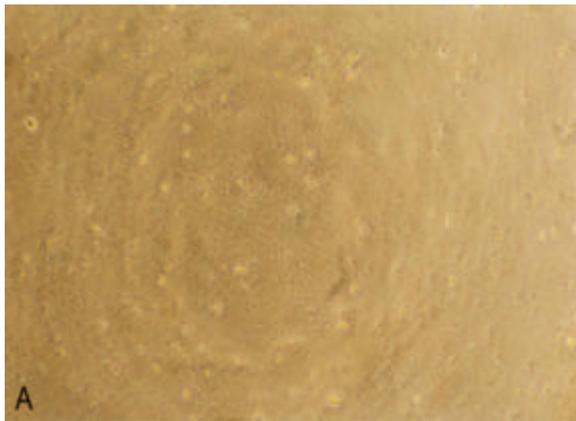


Abbildung 12: Immortalisierte Keratozyten (HCKi) nach 72h Inkubation mit dem Wirkstoff Cetrimid bei insgesamt 96h Kulturdauer. Lichtmikroskopisches Bild von Zellkulturen (angegeben ist immer die Originalvergrößerung auf Bildebene).

- A: HCKi Kontrolle x 50**
- B: HCKi 100µg/ml Cetrimid x 50**
- C: HCKi 10µg/ml Cetrimid x 50**
- D: HCKi 1µg/ml Cetrimid x 50**
- E: HCKi 1µg/ml Cetrimid x 200**
- F: HCKi 0,1µg/ml Cetrimid x 50**

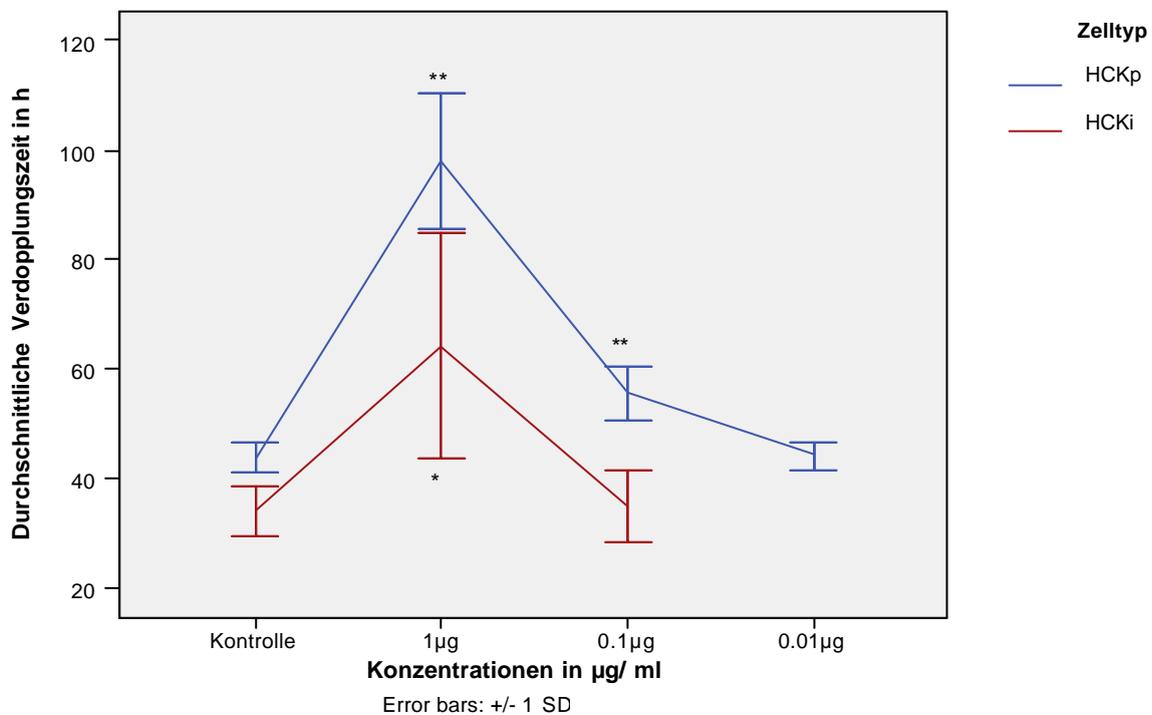
4.4.2 Auswertung der Verdopplungszeit

Die primären und immortalisierten Keratozyten wurden wie oben beschrieben über einen Zeitraum von 72h mit dem Konservierungsmittel Cetrimid inkubiert, wobei die Zellen insgesamt über 96h in Kultur waren. Die Verdopplungszeit der Zellkultur wurde mit der ebenfalls oben beschriebenen Formel berechnet.

4.4.2.1 Auswertung der Verdopplungszeit bei mit Cetrimid behandelten HCKp

Es gilt $n=10$ für alle Konzentrationen außer bei $0,1\mu\text{g/ml}$ $n=11$. Bei den primären Keratozyten wiesen zwei der mit der Kontrolle verglichenen Vergleichsgruppen eine signifikante Verlängerung der Verdopplungszeit auf (ANOVA $p < 0,0001$).

Die Kontrolle erbrachte eine Verdopplungszeit von 43,65 Stunden bei einer Standardabweichung von $\pm 2,69$ Stunden (Graphik 10). In der mit $1\mu\text{g/ml}$ Cetrimid behandelten Vergleichsgruppe zeigte sich eine um 124,20% (!) signifikant verlängerte Verdopplungszeit mit einem Wert von $97,86 \pm 12,48$ Stunden ($p < 0,0001$). Im Vergleich zur Kontrolle errechnete sich bei einer Cetrimid-Konzentration von $0,1\mu\text{g/ml}$ eine um 26,99% signifikante Verlängerung der Verdopplungszeit auf $55,43 \pm 4,83$ Stunden ($p < 0,0001$). Die mit $0,01\mu\text{g/ml}$ behandelte Vergleichsgruppe zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle ($p = 0,886$). Die Verdopplungszeit betrug 44,09 Stunden bei einer Standardabweichung von $\pm 2,65$ Stunden.



Graphik 10: Durchschnittliche Verdopplungszeit in Stunden bei mit Cetrimid behandelten HCKp und HCKi. Die Inkubationsdauer mit Cetrimid betrug 72 Stunden bei insgesamt 96 stündiger Kulturdauer. $n=10$ für alle Konzentrationen außer $n=11$ bei der Konzentration $0,1\mu\text{g/ml}$. * = $p < 0,0001$. ** = $p < 0,0001$.

4.4.2.2 Auswertung der Verdopplungszeit bei mit Cetrimid behandelten HCKi

Es gilt $n=12$ für die Kontrolle, $n=11$ für $1\mu\text{g/ml}$ und $n=10$ für $0,1\mu\text{g/ml}$.

Der Varianzvergleich mittels ANOVA zeigte eine Signifikanz von $p < 0,0001$.

Die Kontrolle wies eine Verdopplungszeit von 34 Stunden auf bei einer Standardabweichung von $\pm 4,59$ Stunden (Graphik 10). Die mit $1\mu\text{g/ml}$ Cetrimid behandelte Vergleichsgruppe zeigte eine um 88,87 % signifikant verlängerte Verdopplungszeit auf 64,22 Stunden bei einer Standardabweichung von $\pm 20,54$ Stunden ($p < 0,0001$). Keine Signifikanz wies die mit $0,1\mu\text{g/ml}$ Cetrimid behandelte Konzentration auf. Für die Verdopplungszeit errechneten sich $34,80 \pm 6,33$ Stunden.

4.4.3 Auswertung der Proliferationsergebnisse der mit Cetrimid behandelten Zellkulturen

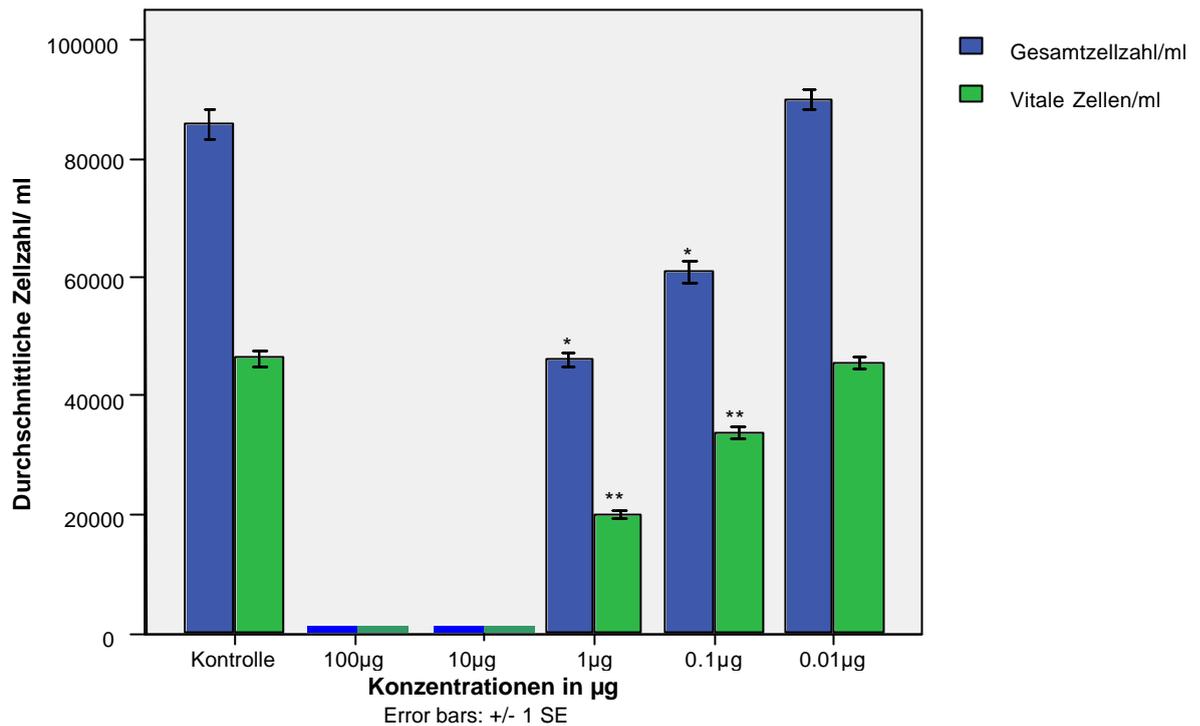
In diesem Versuchsansatz wurde untersucht wie HCKi auf den Wirkstoff Cetrimid reagierten. Dafür wurden die Zellen mit den Konzentrationen $100\mu\text{g/ml}$, $10\mu\text{g/ml}$, $1\mu\text{g/ml}$, $0,1\mu\text{g/ml}$ und bei den primären Zellen zusätzlich noch mit der Konzentration $0,01\mu\text{g/ml}$ über einen Zeitraum von 72 Stunden inkubiert. Sowohl die Kontrolle als auch die restlichen Konzentrationen befanden sich insgesamt über 96 Stunden in Kultur. Da der Zellcounter für die Konzentrationen $100\mu\text{g/ml}$ und $10\mu\text{g/ml}$ keine validen Werte liefern konnte, wurden diese gleich Null gesetzt, da klinisch bzw. unter dem Lichtmikroskop keine vitalen Zellen mehr nachgewiesen werden konnten (siehe Abb. 11, 12 B/C). Aus diesem Grund wurden diese Konzentrationen aus der statistischen Wertung herausgenommen. Alle restlichen Konzentrationen wurden mit der jeweiligen Kontrolle verglichen. Untersucht wurden die Gesamtzellzahl als auch die Zellzahl der vitalen Zellen.

4.4.3.1 Auswertung der Cetrimid-Proliferationsergebnisse bei HCKp

Die Kontrolle der gesamten primären Keratozyten erreichte eine Zellzahl von $85827 \pm 2544,99$ Standardfehler. Der Anteil an vitalen Zellen war hierbei bei der Kontrolle $46328 \pm 1303,31$ (Graphik 11). N war für alle Konzentrationen gleich 10.

Sowohl in der Gruppe der Gesamt- als auch der Vital-Zellzahl konnte in den Konzentrationen $1\mu\text{g/ml}$ und $0,1\mu\text{g/ml}$ ein hochsignifikantes Absinken der Zellzahl zur jeweiligen Kontrolle festgestellt werden. Der p -Wert betrug für diese Konzentrationen jeweils $< 0,0001$.

Die geringste Konzentration $0,01\mu\text{g/ml}$ zeigte in beiden Vergleichsgruppen keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Der p -Wert betrug bei der Gesamtzellzahl hierbei 0,196 und bei der Vital-Zellzahl 0,679.

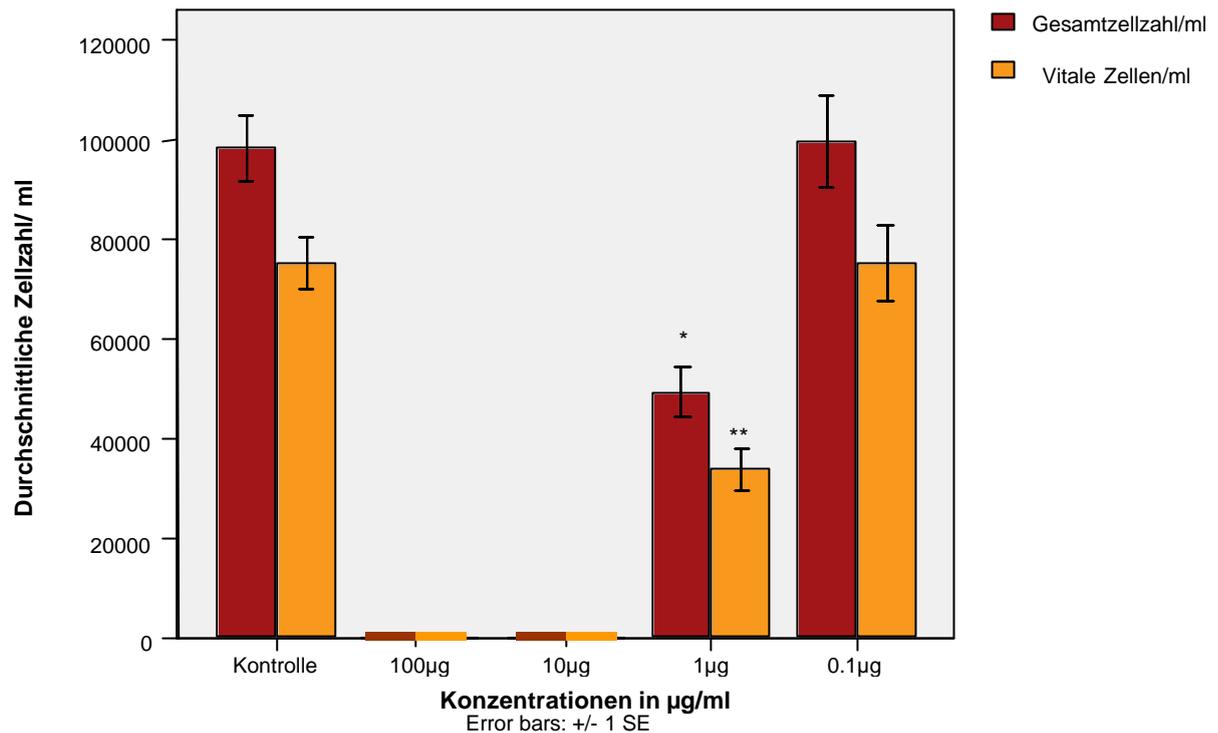


Graphik 11: Durchschnittliche Zellzahl der gesamten und vitalen primären Keratozyten, die mit Cetrimid behandelt wurden. Die Konzentrationen 100µg/ml und 10µg/ml wurden gleich Null gesetzt. *= Signifikanter Unterschied zur Kontrolle in der Gruppe der Gesamtzellzahl. **=Signifikanter Unterschied in der Gruppe der Vital-Zellzahl.

4.4.3.2 Auswertung der Cetrimid-Proliferationsergebnisse bei HCKi

Die Kontrolle zeigte eine Zellzahl von 98238,33 +/- 6553,30 Standardfehler in der Gruppe der gesamten Keratozyten. Der Anteil der vitalen Zellen lag hierbei bei 75128,33 +/- 5344,67 Zellen (Graphik 12).

Sowohl in der Gruppe der gesamten als auch der vitalen Keratozyten zeigte sich ein hochsignifikantes Absinken der jeweiligen Zellzahl auf 49579,09 +/- 5034,75 bzw. 33780 +/- 4176,50 bei einer Cetrimid-Konzentration von 1µg/ml (jeweils $p < 0,0001$). Kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle wurde bei der Konzentration 0,1µg/ml festgestellt ($p = 0,912$ bzw. 0,991).

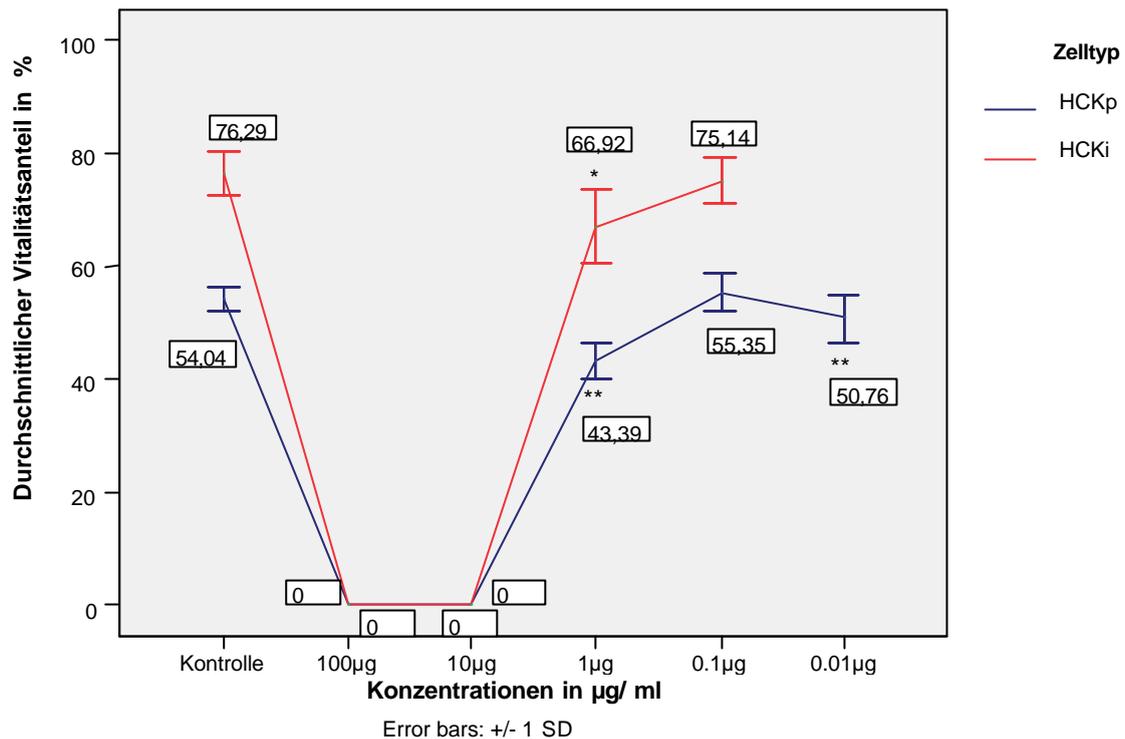


Graphik 12: Durchschnittliche Zellzahl der gesamten und vitalen immortalisierten Keratozyten, die mit Cetrimid behandelt wurden. Die Konzentrationen 100µg/ml und 10µg/ml wurden gleich Null gesetzt. * = Signifikanter Unterschied zur Kontrolle in der Gruppe der Gesamtzellzahl. **=Signifikanter Unterschied in der Gruppe der Vital-Zellzahl.

4.4.4 Auswertung des Vitalitätsanteils der mit Cetrimid behandelten Zellkulturen

4.4.4.1 Auswertung des Vitalitätsanteils der mit Cetrimid behandelten HCKp

Die Kontrolle der Vitalität wies für die primären Keratozyten einen Prozentsatz von 54,04% +/- 2,20 % Standardabweichung auf (Graphik 13). Bei der Konzentration 1µg/ml konnte ein hochsignifikantes Absinken des Vitalitätsanteils mit einem p-Wert von < 0,0001 nachgewiesen werden. Die Konzentration 0,1µg/ml zeigte keinen signifikanten Unterschied mehr zur Kontrolle (p= 0,324). Auffällig war jedoch, dass bei der um eine zehner- Potenz niedrigeren Konzentration der Vitalitätsanteil mit einem p-Wert von 0,040 wieder signifikant herabgesetzt war, obwohl von der Zellzahl her keine Signifikanz nachgewiesen werden konnte (siehe oben).

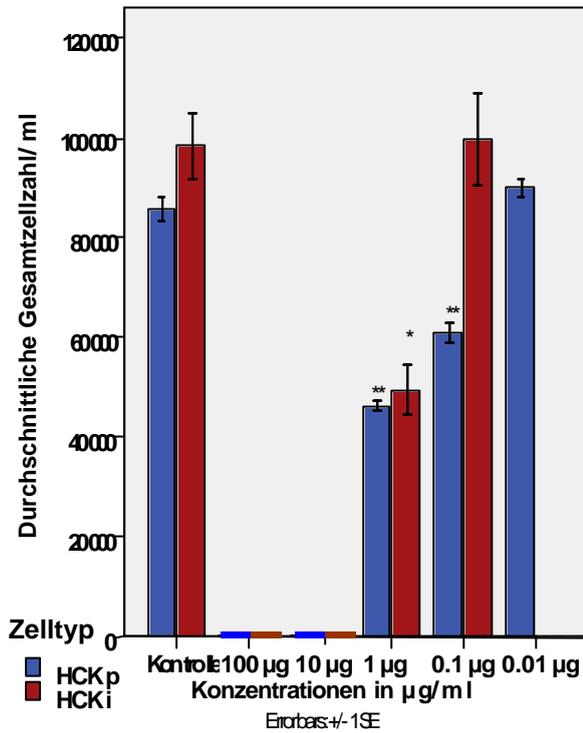


Graphik 13: Anteil der vitalen Zellen an der Gesamtzellzahl in % für die mit Cetrimid behandelten Keratozyten. ** = Signifikanter Unterschied zur Kontrolle bei HCKp. * = Signifikanter Unterschied zur Kontrolle bei HCKi.

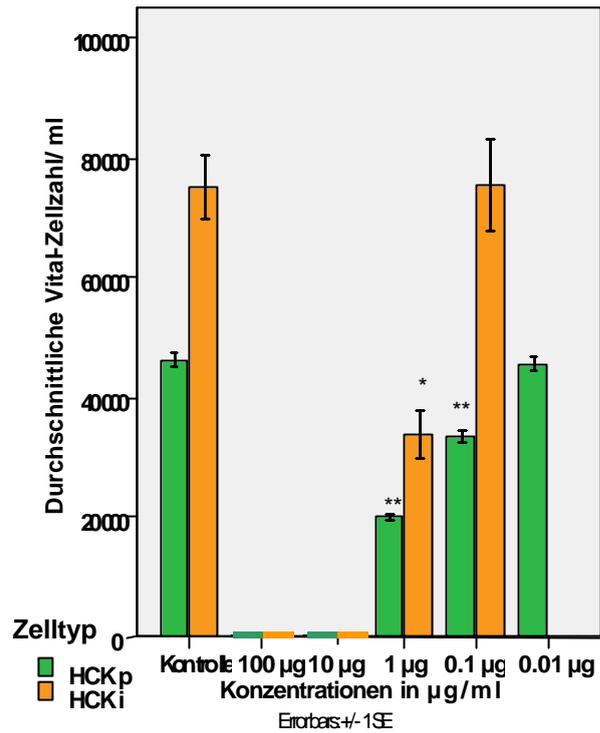
4.4.4.2 Auswertung des Vitalitätsanteils der mit Cetrimid behandelten HCKi

Die Kontrolle erreichte einen durchschnittlichen Wert von 76,28% +/- 3,78% Standardabweichung (Graphik 13). Bei einer Konzentration von 1µg/ml war der Vitalitätsanteil noch signifikant herabgesetzt ($p < 0,0001$). Erst ab einer Konzentration von 0,1µg/ml war keine Signifikanz mehr nachweisbar ($p = 0,491$).

4.4.5 Vergleich der Ergebnisse zwischen primären und immortalisierten Keratozyten



Graphik 14: Durchschnittliche Gesamtzellzahl/ml von mit Cetrimid behandelten HCKp und HCKi. **= Signifikanter Unterschied zur Kontrolle bei HCKp. *= Signifikanter Unterschied zur Kontrolle bei HCKi.



Graphik 15: Durchschnittliche Vital-Zellzahl/ml von mit Cetrimid behandelten HCKp und HCKi. **= Signifikanter Unterschied zur Kontrolle bei HCKp. *= Signifikanter Unterschied zur Kontrolle bei HCKi.

4.4.5.1 Vergleich der mit Cetrimid behandelten HCKp und HCKi

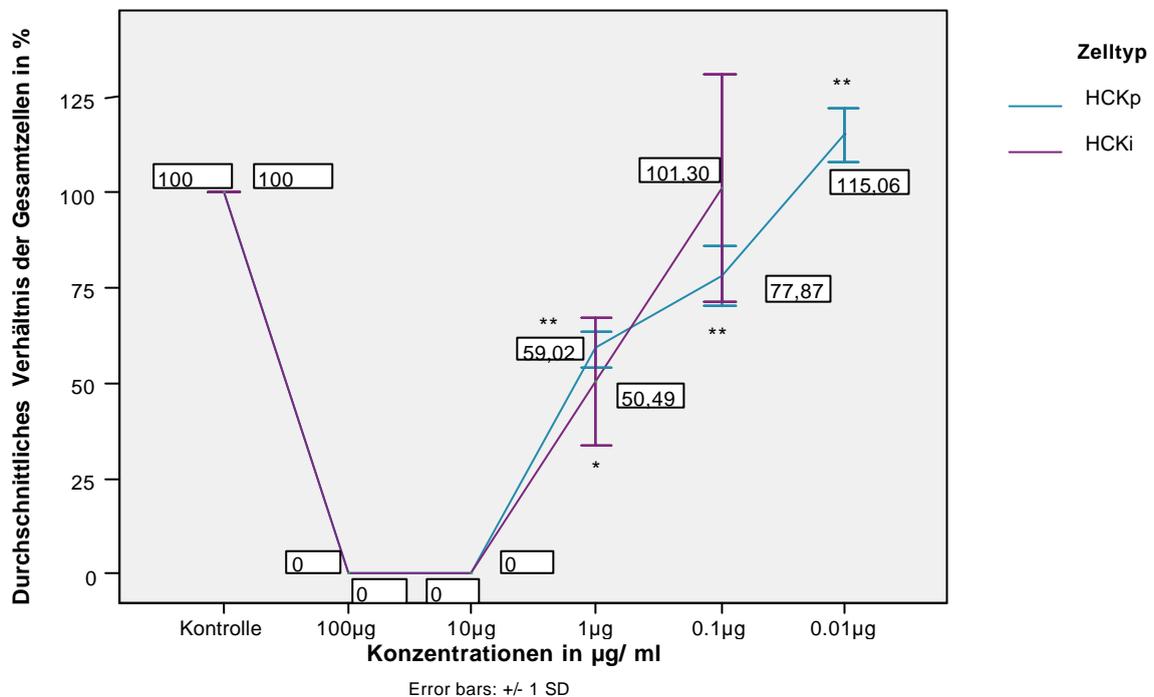
In der untersuchten Gruppe der HCKp zeigten sich in der prozentualen Gesamtzellzahl in allen Konzentrationen hochsignifikante Unterschiede zur Kontrolle (jeweils $p < 0,0001$). In den Konzentrationen 1µg/ml und 0,1µg/ml war die Zellzahl signifikant um 41% bzw. 23% erniedrigt. Die Konzentration 0,01µg/ml jedoch zeigte einen deutlichen Wiederanstieg der Zellzahl, der nun signifikant höher als die Kontrolle war.

In der Gruppe der HCKi sah man ebenfalls eine hochsignifikante Absenkung der Gesamtzellzahl um etwa die Hälfte bei einem p-Wert von $<0,0001$. Ab einer Konzentration von 0,1µg/ml Cetrimid jedoch wurde kein signifikanter Unterschied mehr zur Kontrolle festgestellt ($p = 0,893$). (Graphik 16)

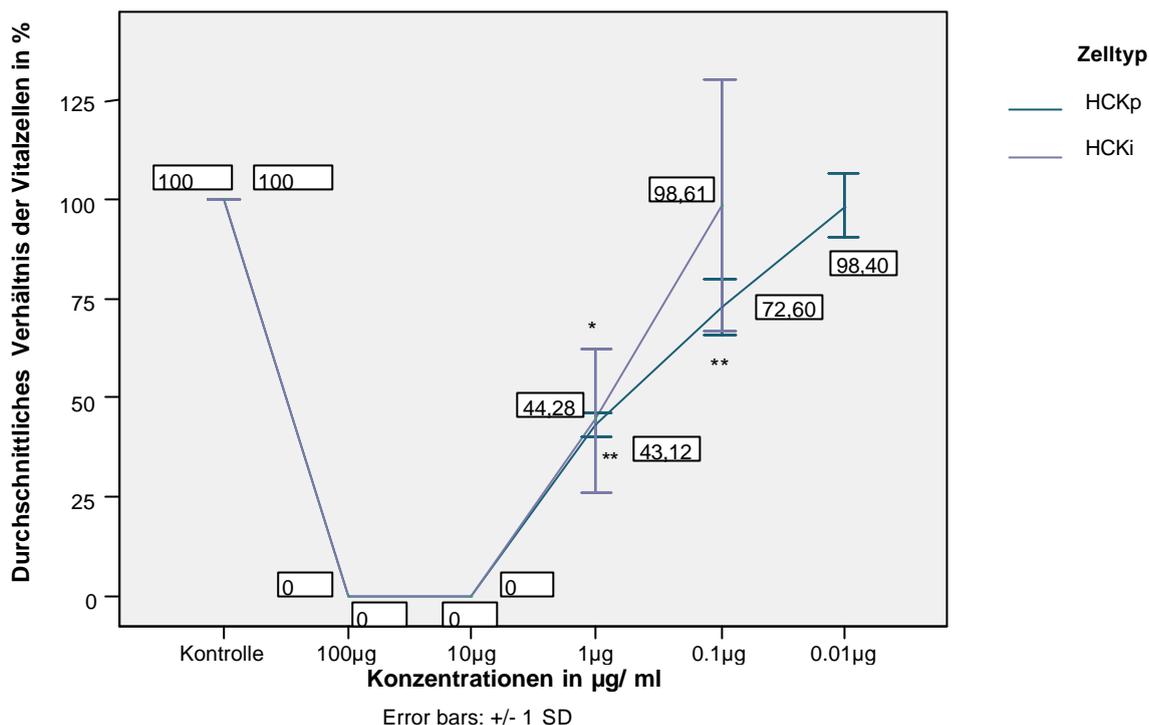
Die vitalen HCKp zeigten in den Konzentrationen 1µg/ml und 0,1µg/ml einen Abfall der Zellzahl um 57% bzw. 28%. Der p-Wert war für beide Konzentrationen < 0,0001 und damit hochsignifikant. Die Konzentration 0,01µg/ml wies keinen signifikanten Unterschied mehr im Vergleich zur Kontrolle auf (p = 0,548).

Auch bei den HCKi wurde ein hochsignifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle in der Konzentration 1µg/ml Cetrimid festgestellt. Hierbei war die Zellzahl um etwa 56% gesunken (p=< 0,0001). Im Gegensatz zu den HCKp wurde bereits ab einer Konzentration von 0,1µg/ml kein statistischer Unterschied mehr im Vergleich zur Kontrolle festgestellt (p= 0,893).

(Graphik 17)



Graphik 16: Durchschnittliche Gesamtzellzahl der mit Cetrimid behandelten HCKp und HCKi. **= Signifikanz der primären Keratozyten (HCKp) p <0,0001. *=Signifikanz der immortalisierten Keratozyten (HCKi) p <0,0001.

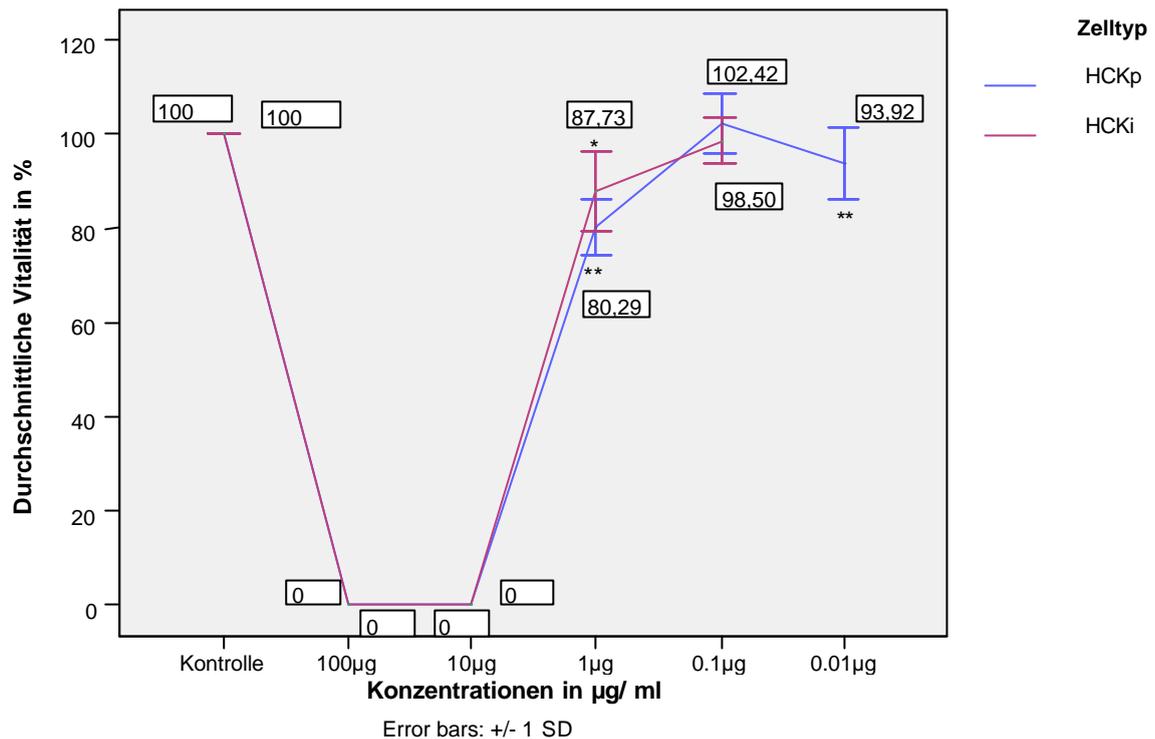


Graphik 17: Durchschnittliche Vital-Zellzahl der mit Cetrimid behandelten HCKp und HCKi.
 **= Signifikanz der primären Keratozyten (HCKp) $p < 0,0001$. *=Signifikanz der immortalisierten Keratozyten (HCKi) $p < 0,0001$.

4.4.5.2 Vergleich der Vitalität zwischen mit Cetrimid behandelten HCKp und HCKi

Die Vitalität (siehe Graphik 18) der primären Keratozyten war bei einer Konzentration von $1\mu\text{g/ml}$ mit einem p-Wert von $< 0,0001$ hochsignifikant herabgesetzt. Bei der nächst niedrigeren Konzentration wurde keine statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Mit einem p-Wert von 0,033 war jedoch die letzte Konzentration ($0,01\mu\text{g/ml}$) wieder signifikant um etwa 7% herabgesetzt.

In der Gruppe der immortalisierten Keratozyten zeigte sich ein signifikanter Abfall der Vitalität um etwa 13% bei der Konzentration $1\mu\text{g/ml}$ ($p = 0,001$). Die Konzentration $0,1\mu\text{g/ml}$ wies keinen signifikanten Unterschied mehr zur Kontrolle auf, wobei der p-Wert hierbei 0,372 betrug.



Graphik 18: Durchschnittliche Vitalität in % der mit Cetrimid behandelten HCKp und HCKi. **= Signifikanz für primäre Keratozyten bei 1µg/ml p= <0,0001, bei 0,01µg/ml p= <0,05. *= Signifikanz für immortalisierte Keratozyten p= 0,001.

4.5 Ergebnisse des TUNEL-Assays (Cetrimid)

In der Gruppe der mit 100µg/ml Cetrimid behandelten Keratozyten sind keine vitalen Zellen mehr vorhanden, sowohl bei den primären als auch bei den immortalisierten Zellreihen. Die Zellen sind nekrotisch und am Untergrund durch die schnelle Schädigung fixiert (Abb. 13 B/G). Ab der Konzentration 1µg/ml steigt die Zellzahl der Keratozyten pro Gesichtsfeld wieder deutlich in beiden Zellreihen an. Bei den primären Keratozyten erkennt man in der Konzentration 1µg/ml eine durch Apoptose bereits aufgelöste Zelle (Abb. 13 C mit einem Pfeil markiert). Auch in der Gruppe der immortalisierten Keratozyten sind in Abbildung 13 H mehrere Apoptosen mit einer Chromatinverdichtung und –verlagerung in Richtung Zellrand (Pfeil) zu erkennen. Aufgrund der nur vereinzelt auftretenden Apoptosen, die auch einer Kontrollpopulation entsprechen, wurde von einer quantitativen Analyse abgesehen. Bei den restlichen Konzentrationen wurden keine Apoptosen detektiert.

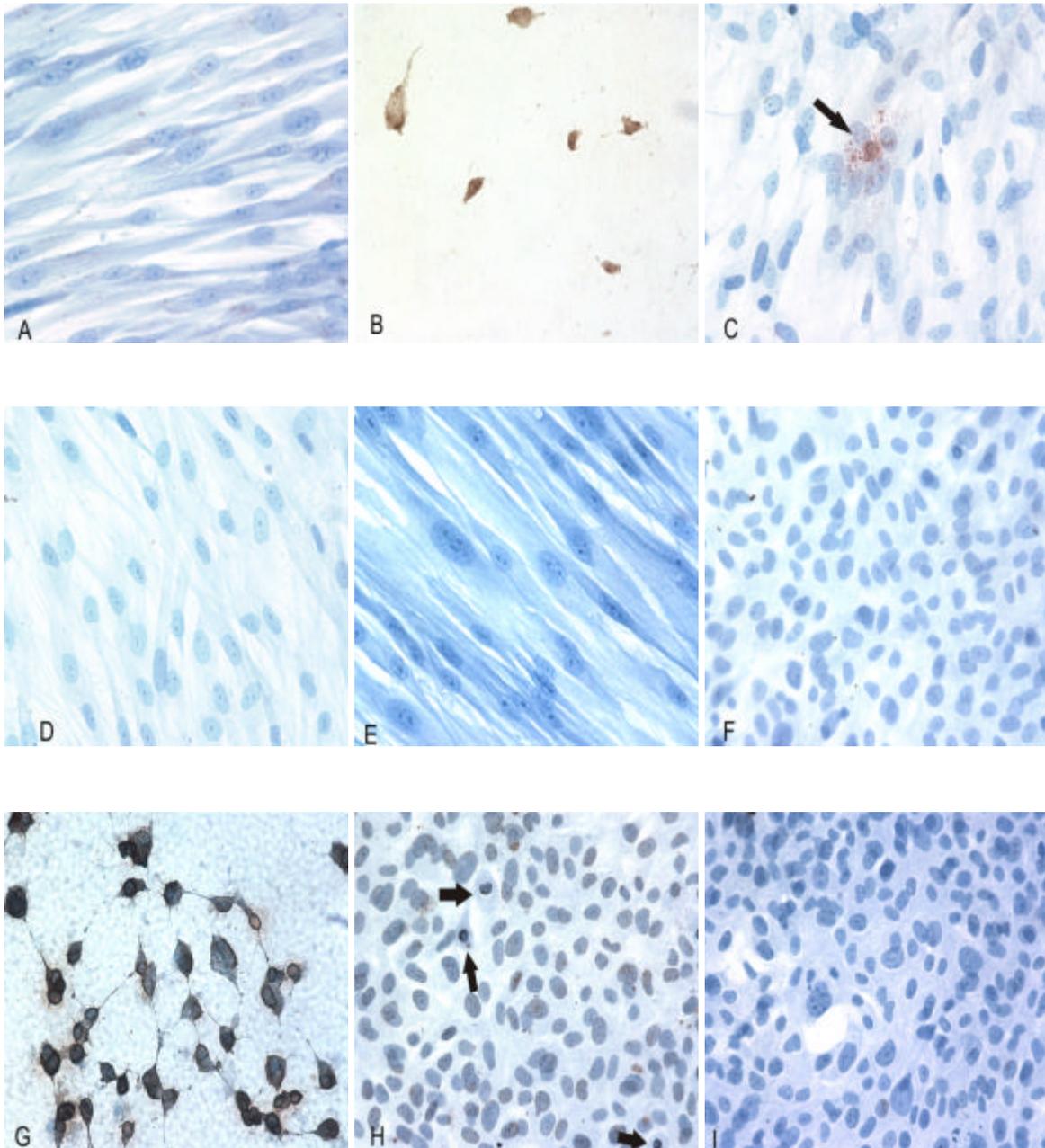


Abbildung 13: TUNEL-Färbung der mit Cetrimid behandelten primären und immortalisierten Keratozyten. Vergrößerung x 400 (auf Originalbildebene)

A: HCKp Kontrolle B: HCKp 100µg/ml C: HCKp 1µg/ml D: HCKp 0,1µg/ml E: HCKp 0,01µg/ml
F: HCKi Kontrolle G: HCKi 100µg/ml H: HCKi 1µg/ml I: HCKi 0,1µg/ml

4.6 Ergebnisse des Annexin-V-Fluorescein/Propidium-Assays (Cetrimid)

In der Kontrollgruppe wurden keine Anfärbungen mit Annexin-V-Fluorescein oder Propidiumiodid gesehen. Man erkennt in der Gruppe der höchsten Konzentration deutlich eine Anfärbung sowohl der primären als auch der immortalisierten Keratozyten mit beiden Substanzen. Dies spricht für eine nekrotische Schädigung der Zellen (Abb. 14,15 D/E/F). In den restlichen geprüften Konzentrationen wurden keine nekrotischen oder apoptotischen Schädigungen detektiert.

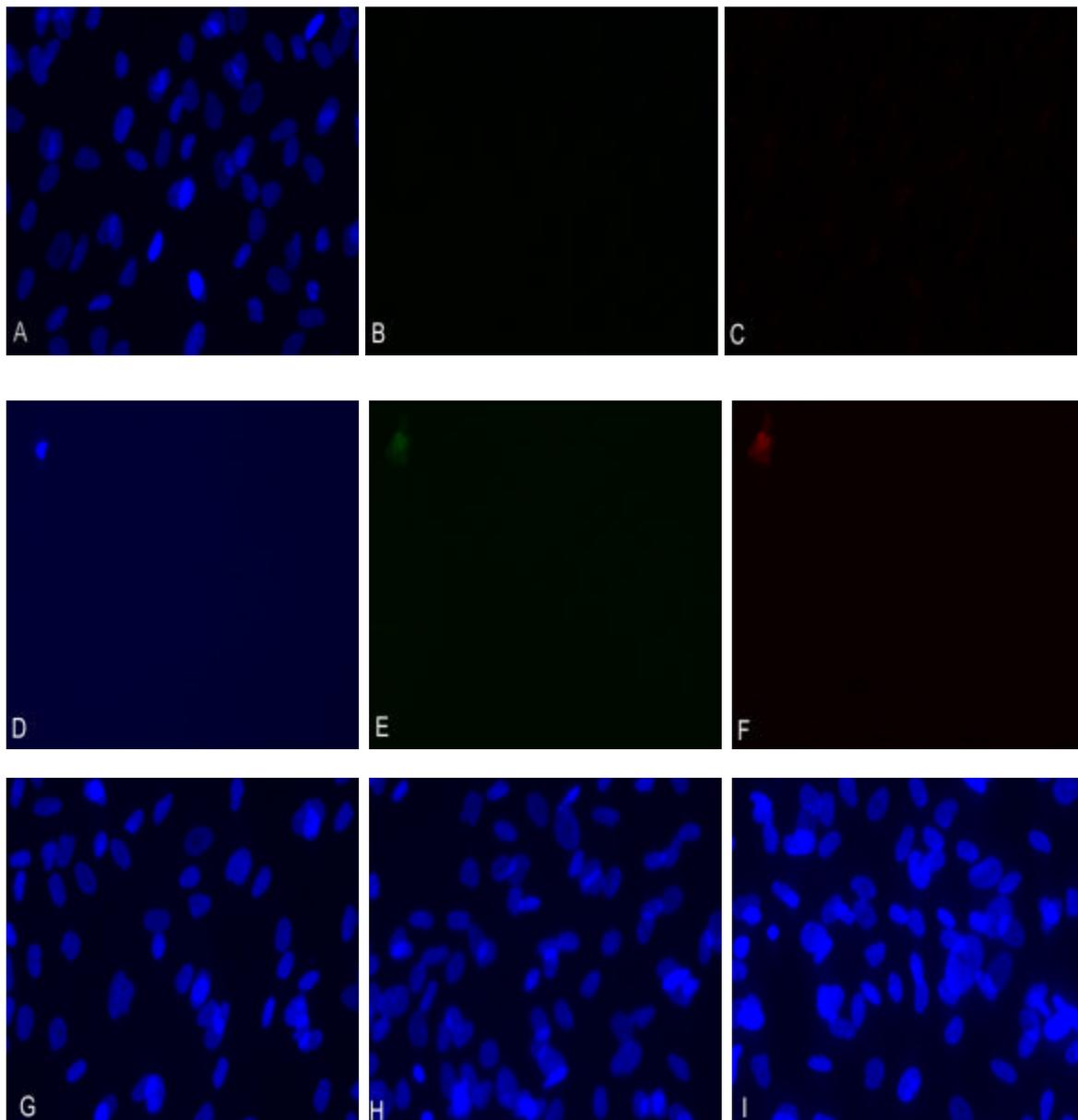


Abbildung 14: Fluoreszenzfärbung der mit Cetrimid behandelten immortalisierten Keratozyten. Vergrößerung x 400 (Vergrößerung auf Originalbildebene)

**A: Kontrolle HCKp DAPI B: Kontrolle HCKp Annexin-V-Färbung C: Kontrolle HCKp Propidiumiodid
D: 100µg/ml HCKp DAPI E: 100µg/ml HCKp Annexin-V-Färbung F: 100µg/ml HCKp Propidiumiodid
G: 1µg/ml HCKp DAPI H: 0,1µg/ml HCKp DAPI I: 0,01µg/ml HCKp DAPI**

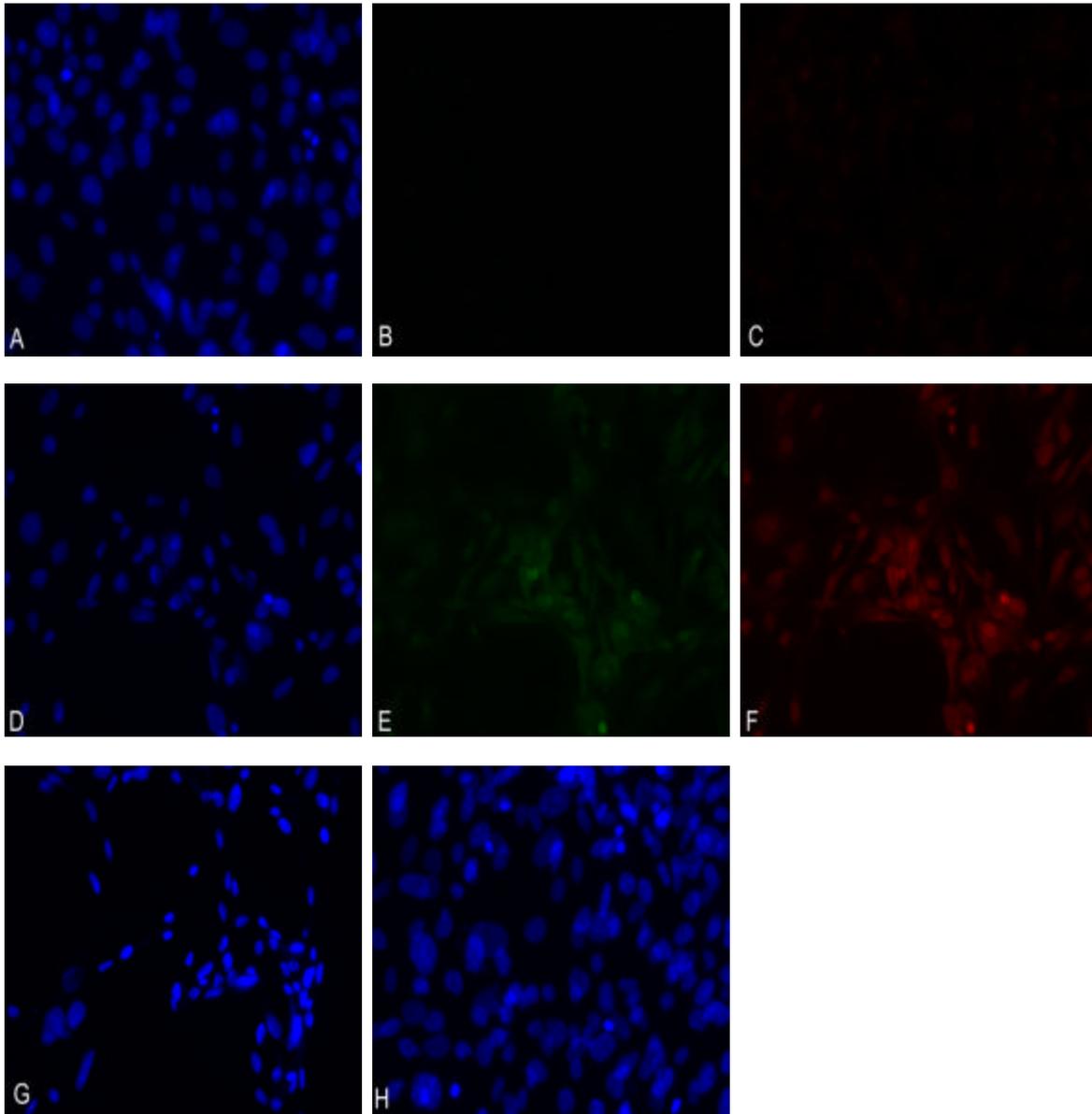


Abbildung 15: Fluoreszenzfärbung der mit Cetrimid behandelten immortalisierten Keratozyten. Vergrößerung x 400 (Vergrößerung auf Originalbildebene)

- A: Kontrolle HCKi DAPI**
- B: Kontrolle HCKi Annexin-V-Färbung**
- C: Kontrolle HCKi Propidiumiodid**
- D: 100µg/ml HCKi DAPI**
- E: 100µg/ml HCKi Annexin-V-Färbung**
- F: 100µg/ml HCKi Propidiumiodid**
- G: 1µg/ml HCKi DAPI**
- F: 0,1µg/ml HCKi DAPI**

3. DISKUSSION

5.1 HCKp versus HCKi – So verschieden und doch gleich?

Beim Vergleich beider Zellreihen zeigten sich schon bei der Kultivierung der Zellen Unterschiede im Phänotyp und im Proliferationsverhalten. Diese Unterschiede wurden durch eine qualitative mikroskopische, aber auch quantitative Auswertung mit dem Casy- Zellcounter unter Berücksichtigung der berechneten Verdopplungszeit bestätigt.

5.1.1 Morphologie

Keratozyten sind flache, dendritische Zellen mesenchymalen Ursprungs, die durch lange zelluläre Ausläufer in einem Netzwerk miteinander verbunden sind und normaler Weise in der G0-Phase vorliegen. Ihre Hauptaufgabe ist es, die Bestandteile der extrazellulären Matrix zu sezernieren, außerdem spielen sie im aktivierten Zustand eine wichtige Rolle bei der Wundheilung.^{6,7,39,46}

Immortalisierte Endothel- und Epithelzellen konnten bereits von den Arbeitsgruppen von Bednarz et al.⁶⁴ und von Araki-Sasaki et al.⁶³ etabliert werden. Hierbei ist von besonderem Interesse, dass die immortalisierten Zellen anscheinend einen ähnlichen Phänotyp wie in vivo aufwiesen. Dies ist bei den in der vorliegenden Arbeit verglichenen primären und immortalisierten Keratozyten nicht der Fall (siehe Abb.5/6 A, 11/12 A).

Zum einen sind die immortalisierten Keratozyten (HCKi) kleiner und rundlicher als die primären (HCKp), wobei sie eine Focusbildung aufweisen, zum anderen fehlt ihnen die dendritische Struktur und die Anordnung in einem Netzwerk. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Zorn-Kruppa et al., die einen Verlust der Kontakthemmung der Zellen, die normalerweise durch die zellulären Ausläufer erreicht wird, beschrieben haben. Jedoch wird bei Kultivierung mit 5% FCS eine in vivo ähnliche Morphologie postuliert.⁶⁸

Wilson et al. beschreiben bei humanen cornealen Endothelzellen mit verlängerter Lebensspanne hingegen eine vermehrt uniforme Morphologie im Gegensatz zu nicht-transfizierten Zellen.⁶² Dies entspricht schon eher der Morphologie der verwendeten immortalisierten Keratozyten. Außerdem wird ebenfalls ein Verlust der Zellkontakthemmung beschrieben.¹²⁰

5.1.1.1 Beeinflussende Faktoren

Es stellt sich also die Frage, wodurch diese Unterschiede entstanden sein könnten. Bereits bei anderen immortalisierten Zellreihen wie den Chang oder IOBA-NHS conjunktivalen Epithelzellen sind Unterschiede zu ihren primären Ursprüngen im Hinblick auf Karyotyp, aber auch Phänotyp aufgefallen.^{121,122}

Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede zwischen HCKp und HCKi wäre, dass es unter Serumeinfluss, insbesondere bei Konzentrationen über 10%, zu einer Aktivierung der Zellen kommen kann, so dass die Zellen einen spindelförmigen fibroblastischen Phänotyp annehmen.⁵³

In der vorliegenden Analyse wurden die immortalisierten Zellen mit 5% FCS und die primären mit anfangs 10%igem FCS kultiviert, das relativ schnell auf 5% herunterdosiert wurde, wobei die HCKp-Versuche zum Erreichen einer besseren Adhärenz mit 10% FCS durchgeführt wurden. Das bedeutet, insbesondere die primären Zellen wären dann von einer Aktivierung betroffen. Nichtsdestotrotz haben aber auch andere Arbeitsgruppen Keratozyten in Anwesenheit von Serum kultiviert ohne hierbei eine Aktivierung der Zellen zu bemerken.^{123,124,125}

Andererseits kann bereits das Splitten der Kultur zur Passagierung einen Wund-ähnlichen Reiz für die Zellen darstellen und so eine Aktivierung verursachen.^{6,7} Daher wurden für die Versuche HCKp der 3.Passage gewählt, um den Wundreiz weitgehend zu minimieren, jedoch eine ausreichende Zellzahl und somit eine Homogenität der Versuche zu erreichen.

Außerdem wurde dem Kulturmedium für HCKp Insulin beigefügt, das dafür bekannt ist, den in vivo Phänotyp der Keratozyten zu bewahren.⁵⁴ Auch ist bekannt, dass es bei Kultivierung mit einer hohen Zelldichte zu keiner Aktivierung der Keratozyten kommt.⁵⁵ Insofern könnten sich Insulin und FCS, insbesondere bei einer, wie bei den vorliegenden Versuchen, hohen Zelldichte gegenseitig relativiert haben. Eine Aktivierung der primären Keratozyten kann jedoch mit Sicherheit nicht ausgeschlossen werden.

Natürlich kann die Ursache aber auch bei den HCKi liegen. Neben der Aufhebung der Zell-Kontakthemmungen^{68,120}, sind für immortalisierte Zellen auch chromosomale Aberrationen⁶⁶ und Instabilitäten¹²⁶ beschrieben. Diese könnten den Phänotyp der Zellen nachhaltig verändert haben. Hierfür sind weitere Studien notwendig, die insbesondere auf chromosomale, aber auch biochemische Unterschiede beider Zellreihen eingehen.

5.1.2 Proliferation

In vivo haben Keratozyten eine nur langsame mitotische Aktivität. Der Turn-Over-Zeitraum liegt normalerweise bei etwa zwei Jahren.^{30,39} Gut beschrieben ist, dass hingegen immortalisierte Zellen in vitro stark erhöhte Proliferationsraten aufweisen.^{62,64,68,127} Hierbei werden durch das große SV40 T-Antigen verursachte höhere G1-Transite diskutiert.⁶⁴

Entsprechende Ergebnisse konnten auch in der vorgestellten Arbeit gezeigt werden. So liegt die Kontroll-Vitalzellzahl der HCKi mit 95801 Zellen deutlich über der HCKp Kontroll-Vitalzellzahl, die bei 33379 Zellen in der BAC-Testgruppe liegt. In der Cetrimid-Gruppe weist die Kontrolle der HCKi ebenfalls deutlich höhere Werte als die HCKp-Kontrolle auf.

Insgesamt fiel bereits bei der Kultivierung der HCKi eine viel stärkere Proliferation der Zellen mit erhöhter metabolischer Aktivität auf, die durch einen Farbumschlag des Mediums sichtbar wurde.

5.1.3 Verdopplungszeit

Die Verdopplungszeit ist ein wichtiger Marker bei der Auswertung des Proliferationsverhaltens von Zellen. Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen primären und immortalisierten Keratozyten. Die Verdopplungszeit der HCKi ist entsprechend einer erhöhten Proliferation im Gegensatz zu HCKp verkürzt. Es ergaben sich für die Kontrollen Werte von etwa 30-34 Stunden bei den HCKi im Vergleich zu ca. 43-58 Stunden bei den primären Zellen. Dies passt gut zu den von Zorn-Kruppa et al. für die immortalisierten Keratozyten berechneten Werte, die bei 34 Stunden HCKi-Verdopplungszeit liegen.⁶⁸

Bereits während der Kultivierung war dieser Unterschied durch die unterschiedlich häufige Notwendigkeit zur Passage auffällig.

5.2 Die Wirkung von quartären Ammoniumverbindungen auf Keratozyten

Neben der Arbeit von Zorn-Kruppa et al.⁶⁷ ist die vorgelegte Arbeit nach bestmöglicher Literaturrecherche die einzige, die immortalisierte mit primären Keratozyten anhand von Zytotoxizitätstests vergleicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde im Gegensatz zu der vielfach verwendeten Kurzzeitanalyse mit Einwirkungsauern von etwa 5-60 Minuten einmalig bzw. mehrmals pro Tag mit gegebenenfalls 24 stündiger Regenerationspause, eine Langzeitanalyse von insgesamt 72 Stunden Wirkdauer gewählt, um die Wirkung der Substanzen bei täglich mehrmaligem Gebrauch über einen längeren Zeitraum zu simulieren.

Mit dem CASY 1 Zellcounter wurden sowohl die Zellzahl als auch die Vitalität bestimmt, außerdem wurde zusätzlich die Verdopplungszeit berechnet. Neben einer statistischen Analyse innerhalb der einzelnen Gruppen, war jedoch der direkte Vergleich zwischen beiden Zelllinien von besonderem Interesse. Hierfür wurden die Zellzahlen gleichgesetzt, um die Proliferationsunterschiede (siehe Kap.5.1), die sowohl in Vorversuchen als auch innerhalb der Versuche deutlich wurden, weitgehend auszuschalten.

5.2.1 Die Wirkung von BAC auf HCKp und HCKi im Vergleich

Benzalkoniumchlorid ist trotz seiner gut dokumentierten toxischen Wirkung auf Hornhautzellen immer noch das häufigste in Augentropfen verwendete Konservierungsmittel. Als ein kationisches Tensid schädigt es die präcorneale Lipidschicht, was eine schwere Schädigung des Epithels erst möglich macht^{17,83,128}, außerdem erhöht es die Permeabilität der Cornea.^{17,18,19,82} International werden im Gegensatz zu Deutschland Konzentrationen am häufigsten zwischen 0,004% und 0,02% angegeben, was die Verwendung von 40µg/ml BAC in dieser Studie erklärt.^{83,129} Insgesamt wurden die Konzentrationen 40; 4; 0,4; 0,2 und 0,1µg/ml für 72 Stunden getestet. Hierzulande wird in Augentropfen am häufigsten die Konzentration 0,1mg/ml, die einer 0,01%igen Lösung entspricht, verwendet. Diese Konzentration ist insbesondere an humanen Epithel- oder immortalisierten Chang conjunktivalen Epithelzellen als besonders toxisch beschrieben. Bereits nach 15 Minuten kommt es zu einer sofortigen Lysis der Zellen mit Debrisbildung und einem starken Abfall der Membranintegrität.^{20,130} Außerdem kondensiert das Chromatin und die ROS-Produktion (reactive oxygen species) in den Mitochondrien, insbesondere Wasserstoffperoxid und Super- bzw. Hyperoxid-Anion als Zeichen einer

Zytotoxizität bzw. von oxidativem Stress, steigt signifikant an.^{20,131} Innerhalb von zwei Stunden folgt dann nach Tripathi et al. eine Zelldegeneration mit Sistieren der normalen Cytokinesis, Zellretraktion und aber auch der mitotischen Aktivität.²² Debbasch et al. beschreiben nach 24 Stunden die Entwicklung einer sekundären Nekrose.¹³¹ Auch bei einer Konzentration von 0,005% (50µg/ml) sind von mehreren Autoren schwere Zeldysfunktionen mit Abnahme der Membranintegrität und Chromatinkondensation bereits nach kurzer Einwirkungsdauer beschrieben.^{20,83,129,130} Eine 0,001%ige BAC-Lösung verursacht bei Cha et al. nach 30 Minuten eine schwerwiegende Zeldysfunktion, die mit einer Störung der Barrierefunktion und Membranintegrität einhergeht.⁸³ Aber auch hier reichen bereits 15 Minuten aus, um nach 24 Stunden einen Membranintegritätsabfall mit Chromatinkondensation und starker ROS-Produktion zu verursachen.²⁰ Sogar zwei mal 10 Minuten mit dazwischen liegender 24stündiger Regenerationspause führen 24 Stunden später bei de Saint Jean et al. zu einem signifikanten Abfall der Zellzahl.¹³² Wu et al. beschreiben bei humanen Keratozyten eine Wachstumsinhibierung nach 100 Minuten Einwirkdauer.¹³³ Bei einer Konzentration von 0,0001% (= 1µg/ml) sind Wachstumshemmung¹³² und bei Konzentrationen von 0,00001% (=0,1µg/ml) nur noch erhöhte ROS-Werte beschrieben^{20,79}, wobei Brasnu et al. hier für immortalisierte IOBA-NHC konjunktivale Epithelzellen einen Anstieg der Vitalität durch höhere Proliferation beschreiben.¹³⁰

In beiden Zellreihen waren in den Konzentrationen 40 und 4µg/ml keine vitalen Zellen mehr nachweisbar. Dies ist mit den von anderen Autoren beschriebenen Ergebnissen konsistent, da die Wirkung von BAC eine zeitabhängige Komponente aufweist, und schwerste Schäden nach einer Einwirkungsdauer von 72 Stunden zu erwarten waren. Ab einer Konzentration von 0,4µg/ml wurden in allen Vergleichsgruppen wieder der Kontrolle entsprechende Zellzahlen festgestellt. Hierbei ist anzumerken, dass im direkten Vergleich zwischen beiden Zellreihen, die HCKp bei Konzentrationen = 0,4µg/ml die Vitalzellzahl der Kontrolle bei einem signifikanten Vitalitätsverlust zwar erreichten, wobei der Vitalitätsverlust in der niedrigsten Konzentration (0,1µg/ml) nur noch knapp signifikant war (p= 0,047), was insgesamt stimmig zu den Ergebnissen von Debbasch et al. ist.^{20,79} Nur bei HCKi jedoch stieg die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle signifikant ohne (!) einen Vitalitätsverlust an, auf bis zu 232,48% in der Konzentration 0,2µg/ml. Dies lässt sich einerseits durch höhere Proliferationsraten der immortalisierten Keratozyten erklären, andererseits ist hieraus vor allem auf eine höhere Regenerations- und Widerstandsfähigkeit der HCKi zu schließen.

Zorn-Kruppa et al. konnten hingegen keinen signifikanten Unterschied zwischen HCKp und HCKi nach BAC-Einwirkung feststellen.⁶⁷ Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurden die Zellen jedoch nur für 60 Minuten mit anschließender Regenerationspause in normalem Medium von 24 Stunden behandelt, sodass nahelegt, dass durch die kürzere Einwirkungsdauer und somit schwächere Wirkung die Unterschiede zwischen beiden Zellreihen nicht so stark ausgeprägt waren.

Unerwartet war die Verkürzung der Verdopplungszeit, die bei den HCKp tendenziell, bei den HCKi hingegen signifikant ausfiel. In geringen Konzentrationen, insbesondere bei 0,2µg/ml, scheint BAC einen proliferativen Effekt aufzuweisen.

5.2.2 Die Wirkung von Cetrimid auf HCKp und HCKi im Vergleich

Im Gegensatz zu BAC führt Cetrimid in Studien ein Schattendasein, obwohl es relativ oft in Augentropfen Verwendung findet. In den wenigen zu dieser Substanz verfassten Studien, wird zumeist eine ähnliche Wirkung von Cetrimid und BAC als Mitglieder der selben Gruppe, nämlich der quartären Ammoniumverbindungen, postuliert.^{20,79} Kasper et al. beschreiben sogar eine geringere Toxizität von Cetrimid, wobei hier beachtet werden muss, dass diese Arbeitsgruppe Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) verwendet hat.²³ Normalerweise bestehen die zur Konservierung verwendeten Lösungen aber aus Trimethyltetradecylammoniumbromid mit geringen Anteilen von Dodecyl- und Hexadecyltrimethylammoniumbromid (siehe Kap.1.4.2), so dass sich hieraus Unterschiede ergeben können.⁹⁰ Der Gebrauch der Bezeichnung Cetrimid kann daher etwas verwirrend sein, da er für beide Mischungen gebraucht wird. In dieser Arbeit wird nur die in Augentropfen verwendete Mischung als Cetrimid bezeichnet.

Für CTAB wird von van Ruissen et al. eine ²⁴LD₅₀, also die mittlere letale Dosis, die innerhalb von 24 Stunden eine 50%ige Reduktion der vitalen Zellen verursacht, von 3µg/ml bei Hautkeratinozyten angegeben.¹³⁴ Wie auch für BAC werden Schädigungen der Membranintegrität durch Cetrimid nach nur 15 Minuten Einwirkzeit in den Konzentrationen 0,01% und 0,005% angegeben. Bis zu einer Konzentration von 0,00001% (= 0,1µg/ml) ist jedoch noch eine Erhöhung der ROS-Produktion bei normaler Zellzahl festgestellt worden.^{20,79}

In der vorgelegten Arbeit wurden die Cetrimid-Konzentrationen 100; 10; 1; 0,1 und bei HCKp zusätzlich 0,01µg/ml getestet. 1µg/ml führte zu einem 56 bzw. 57%igen hochsignifikanten Abfall der Vitalzellzahl bei den HCKi bzw. HCKp, was den Ergebnissen von van Ruissen et al.

in etwa entspricht.¹³⁴ Zwar ist die Konzentration um 2µg geringer als bei van Ruissen et al. angegeben, dies ist jedoch durch die längere Einwirkdauer (72 Stunden), durch Zellunterschiede zwischen Hautkeratinozyten und cornealen Keratozyten und durch mögliche Unterschiede zwischen CTAB und Cetrimid zu erklären.

Interessant ist, dass bei den HCKi ab einer Konzentration von 0,1µg/ml kein signifikanter Unterschied mehr sowohl in der Zellzahl als auch in der Vitalität zur Kontrolle nachgewiesen wurde. Dies entspricht den Ergebnissen von Debbasch et al.²⁰ Im Gegensatz hierzu erreichten die primären Keratozyten erst ab der Konzentration 0,01µg/ml keinen signifikanten Unterschied mehr zur Kontrolle, obwohl die Vitalität bereits ab 0,1µg/ml keine Signifikanz mehr zeigte. Eine Erklärung hierfür wäre eine höhere Widerstands- und Regenerationsfähigkeit der immortalisierten Zellen bzw. im Umkehrschluss eine höhere Sensitivität primärer Zellen. Dies passt zu der erhöhten mitochondrialen Produktion der von Debbasch et al. festgestellten reaktiven Sauerstoffspezies,^{20,79} die durch die hohe Sensitivität der hier verwendeten HCKp und die lange Einwirkdauer von 72 Stunden dann auch zu Einschränkungen der Zellzahl und Vitalität führen könnten. Da die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in dieser Studie nicht untersucht wurden, kann hier keine endgültige Aussage getroffen werden. Unklar ist, warum die Vitalität bei der niedrigsten Konzentration (0,01µg) plötzlich, zwar nur knapp signifikant (p= 0,033), wieder abfällt.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass Cetrimid die Verdopplungszeit sowohl bei den HCKp als auch den HCKi hochsignifikant, bei den primären Keratozyten um bis zu 124,20%, verlängert. Wie auch bei der Zellzahl und der Vitalität ist bei immortalisierten Keratozyten ab der Konzentration = 0,1µg/ml kein Unterschied mehr zur Kontrolle nachweisbar, wohingegen bei den primären Keratozyten erst ab einer Konzentration von 0,01µg/ml die Verdopplungszeit wieder normalisiert ist. Dies spricht für einen stark wachstumshemmenden Effekt von Cetrimid.

5.3 Der durch quartäre Ammoniumverbindungen vermittelte Zelltod

In mehreren Publikationen wird beschrieben, dass quartäre Ammoniumverbindungen in geringen Konzentrationen eine Apoptose, in hohen Konzentrationen eine Nekrose induzieren können.^{20,132} Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nur bedingt bestätigt werden. Insgesamt fielen die Ergebnisse nicht wie erwartet aus.

Da für Cetrimid und BAC ähnlich Ergebnisse detektiert wurden, werden diese hier gemeinsam besprochen.

5.3.1 Apoptose versus Nekrose

Brasnu et al. fanden mittels Annexin-V-Assay, das an das bei apoptotischen Zellen auf die Außenseite der Membran wechselnde Phosphatidylserin bindet, insbesondere späte Apoptosen in den Konzentrationen 0,01%, 0,005% und 0,004% bei spontan immortalisierten DBA-NHC conjunktivalen Epithelzellen nach 15 Minuten Einwirkdauer mit nachfolgender Regenerationspause von 24 Stunden. Bei der ebenfalls immortalisierten Chang conjunktivalen Epithelzelllinie fand er hingegen auch in niedrigen Konzentrationen wie 0,0001% (= 1µg/ml) und 0,00001% (= 0,1µg/ml) aufgrund einer höheren Sensitivität dieser Zelllinie noch späte Apoptosen.¹³⁰ Liang et al. beschreiben nach 15maligem Eintropfen von 0,02%igem BAC in jeweils 5 Minuten Abständen in Kaninchen-Augen einen deutlichen Anstieg apoptotischer Zellen im Limbusbereich und der Conjunktiva mittels TUNEL-Assay.¹³⁵ Auch Baudouin et al. detektierten in der Konzentration 0,02 bis 0,015% mittels Annexin-V viele späte Apoptosen, aber auch viele Nekrosen nach 30 Minuten Wirkdauer.¹³⁶ Hamard et al. geben nach einer Einwirkdauer von 15 Minuten und 24 Stunden Erholung der Zellen in Normalmedium für Trabekelzellen an, dass insgesamt 86% der Zellen in der Konzentration 0,001% Annexin-V-positiv waren, und dass auch eine 0,0001%ige Lösung einen signifikanten Anstieg der Annexin-V-positiven Zellen bewirkte.¹³⁷

In der vorliegenden Studie wurden primäre und immortalisierte Keratozyten mittels Annexin-V-Fluorescein/Propidiumiodid- und mittels TUNEL/Hämatoxylin-Assay gefärbt, um eine Aussage über die Art des von quartären Ammoniumverbindungen vermittelten Zelltodes treffen zu können. Natürlich bestand weiterhin die Frage, ob Unterschiede zwischen beiden Zellreihen detektierbar waren. Getestet wurden jeweils die Konzentration 40; 0,4; 0,2 und 0,1µg/ml für BAC bzw. 100; 1; 0,1 und 0,01µg/ml für Cetrimid. Sowohl für immortalisierte als auch für

primäre Zellen wurden für beide Substanzen ähnliche Ergebnisse festgestellt. Nur in der höchsten Konzentration wurden mit beiden Verfahren Nekrosen, entsprechend den Ergebnissen von Baudouin et al.¹³⁶ und Brasnu et al.¹³⁰, dokumentiert. Erstaunlicherweise entsprachen ab der zweiten Konzentration sowohl in beiden Zellreihen als auch bei beiden Substanzen die Apoptosezahlen einer Kontrollpopulation, so dass von einer quantitativen Analyse abgesehen wurde. Da diese Ergebnisse unerwartet sind, sind sie eher kritisch zu betrachten und bedürfen der weiteren Abklärung.

5.3.2 Doch keine Apoptosen?

Man muss sich zwangsläufig die Frage stellen, wohin die von mehreren Autoren beschriebenen Apoptosen nun „verschwunden“ sind. Oder waren sie nie da? Es ist zu diskutieren, wodurch ein womöglich falsch-negatives Ergebnis ausgelöst worden sein könnte.

Eine Erklärung hierfür wäre, dass ein zu großer Zeitraum in den hier durchgeführten Versuchen gewählt wurde. Die Zellen wären demnach einfach nicht mehr nachweisbar, da sie sich bereits aufgelöst und durch neu proliferierte Zellen ersetzt worden sind. Eine ähnliche Problematik ist auch von Wilson et al. beschrieben. Nach 72 Stunden konnte er und seine Arbeitsgruppe an primären Keratozyten kaum Apoptosen mehr mit dem TUNEL-Assay nachweisen.⁴⁰ Insbesondere ist zu bedenken, dass der TUNEL-Assay nur späte Apoptosen detektiert, die zum Teil auch nicht von Nekrosen unterschieden werden können.¹¹¹

Bei der Auswertung der in dieser Arbeit in beiden Substanzgruppen verwendeten jeweiligen höchsten Konzentration erkennt man deutlich eine Dunkelfärbung der Zellen mit Fixierung auf den Objektträger. Diese beim TUNEL-Assay im Durchlichtmikroskop sichtbare Reaktion bzw. eine Anfärbung der Zellen sowohl mit Annexin-V als auch Propidiumiodid im Fluoreszenzmikroskop ist nur mit einer Nekrose vereinbar. Dies entspricht dem erwarteten Resultat, dass quartäre Ammoniumverbindungen in hohen Dosen eine Nekrose induzieren können. Andererseits beschreiben Debbasch et al. das Auftreten von sekundären Nekrosen, also eine abgebrochene Apoptose, bereits 24 Stunden nach Einwirkung von Benzalkoniumchlorid auf Chang conjunktivale Zellen,¹³¹ wobei auch Wilson et al. eine eher durch Nekrose vermittelte späte Wundreaktion bei Keratozyten vermuteten.⁴⁰ Dies spricht ebenfalls für einen Zeit-induzierten Faktor.

Wenn nun aber Apoptosen niemals vorhanden waren, muss dann davon ausgegangen werden, dass durch quartäre Ammoniumverbindungen geschädigte Zellen nicht über einen Apoptose-

vermittelten Weg absterben? Insbesondere da die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit einen sogar proliferativen Effekt von BAC in geringen Konzentrationen vermuten lassen? Mittlerweile werden beispielsweise für Benzalkoniumchlorid auch alternative Signal- und Todeswege neben dem bekannten über Apoptose oder in hohen Dosen über Nekrose vermittelten Weg diskutiert.

De Saint Jean et al. fielen auf, dass nach einer 10minütigen Einwirkung von BAC 0,001% (=10µg/ml) Chang conjunktivale Epithelzellen zwar abstarben, jedoch ohne jegliche typische Apoptosemerkmale, obwohl die Expression des Apoptosemarkers Apo 2.7 unverändert hoch war. Diese Arbeitsgruppe postulierte daher einen fas-unabhängigen Caspase-Aktivierungsweg, der ohne die Involvierung von p53, Fas oder Fasligand induziert wird.¹³² Buron et al. beschreiben hingegen sogar einen dreifachen Weg als Reaktion auf BAC, erstens den „normalen“ Caspase vermittelten intrinsischen oder extrinsischen Todesweg. Durch eine Caspaseinhibierung konnte Buron und ihre Arbeitsgruppe zeigen, dass dennoch eine Chromatinkondensation der Zellen entstand. Daher vermuteten sie einen völlig caspaseunabhängigen zweiten Weg.⁹⁸ Dieser caspaseunabhängige Weg wird jedoch meist nicht als richtige Apoptose, sondern nur als ein apoptoseartiger Zelltod bezeichnet.¹⁰⁴ Als dritten Weg beschreiben Buron et al. eine an den behandelten Zellen aufgetretene Vakuolenbildung, die einen autophagischen Prozess nahelegt.⁹⁸ Dies ist insbesondere unter der Berücksichtigung sehr interessant, dass Lande et al. die Fähigkeit von primären Keratozyten, Partikel in vitro zu phagozytieren, beschrieben haben.⁴⁹ Man muss davon ausgehen, dass normalerweise in vivo apoptotische bzw. geschädigte Zellen schnell phagozytiert werden. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die durch quartäre Ammoniumverbindungen geschädigten Zellen durch Phagozytose von ihren Nachbarzellen entfernt wurden und nach 72 Stunden nicht mehr nachweisbar waren.

Als letzte Variante bleiben zellkulturabhängige Faktoren. So zeigte sich, dass unbehandelte Zellen, die während der Kultivierung ihre Senseszenz erreicht hatten, aber natürlich vor allem auch geschädigte Zellen während der Versuche, sich abrunden und dann vom Flaschenboden lösen, so dass sie im Medium schwimmen. 72 Stunden sind ein ausreichender Zeitraum, um auch bei geringen Konzentrationen einen sanften Ablösungsweg im Gegensatz zur Fixierung unter hohen Konzentrationen zu gewährleisten. Da die Zellen vor der Fixierung auf dem Objektträger für die Annexin-V- und TUNEL-Versuche mit PBS gespült wurden, und in gewisser Weise ja auch das Eintauchen in Aceton einem Spülen gleichkommt, ist es wahrscheinlich, dass die sich bereits abgelösten Zellen somit entfernt und nicht mitgefärbt wurden.

Insgesamt kommen für das Fehlen der Apoptosen in den mit niedrigeren Konzentrationen von quartären Ammoniumverbindungen behandelten Keratozyten folglich Zeitfaktoren, Zellkulturfaktoren, aber auch die Induktion eines nicht über den normalen Apoptose-vermittelten Zelltodes in Frage. Eine eindeutige Erklärung hierfür ist jedoch nach Stand der Literatur nicht abgebar. Es sind also weitere Studien nötig, die zum einen in mehreren Zeitabständen, zum Beispiel nach 24, 48 und 72 Stunden, das Vorhandensein von Apoptosen nachprüfen, zum anderen die weiter die Signalwege des durch quartäre Ammoniumverbindungen vermittelten Zelltodes anhand von immunhistochemischen und biochemischen Verfahren erforschen.

5.4 BAC versus Cetrimid

Wie weiter oben bereits beschrieben, werden für BAC und Cetrimid als Vertreter der selben Gruppe meist ähnliche Wirkungen genannt.^{20,79} Kasper et al. schreiben auch von einer schwächeren toxischen Wirkung von Cetrimid.²³ Da es in dieser Arbeit mehr um den Vergleich der beiden Zellreihen anhand der Substanzen ging und auch die Konzentrationen in beiden Gruppen unterschiedlich gewählt wurden, konnte kein vollständiger statistischer Vergleich der beiden Konservierungsmittel erfolgen. Aus diesem Grund kann diese Frage nicht mit Sicherheit beantwortet werden. Jedoch sind deutliche Tendenzen bei der Auswertung der Ergebnisse sichtbar geworden.

Wenn man die beiden Zellreihen im direkten Vergleich in der Konzentration 0,1µg/ml betrachtet, so fällt ein deutlicher Unterschied auf. Während bei BAC die Gesamt- und Vitalzellzahl in der Gruppe der HCKp keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle zeigen und in der Gruppe der HCKi sogar ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen ist, fällt die Zellzahl bei Cetrimid in der Gruppe der HCKp immer noch um über 20% und zeigt in der Gruppe der HCKi keinen Unterschied zur Kontrolle. Dies spricht für einen stark wachstumshemmenden Effekt von Cetrimid. Bestätigt wird dies auch bei Betrachtung der Verdopplungszeit in allen Konzentrationen. Während sich bei den mit 0,1µg/ml BAC behandelten Zellen die Verdopplungszeit in beiden Zellreihen verkürzt (für HCKi signifikant), verlängert sie sich hochsignifikant bei Cetrimid in der Gruppe der primären bzw. zeigt keinen Unterschied zur Kontrolle in der Gruppe der immortalisierten Keratozyten. Dies lässt sich nur mit einem leicht proliferativen Effekt von BAC erklären. Brasnu et al. beschreiben bei einer Verwendung von 0,1µg/ml BAC einen Anstieg der Vitalität bei der immortalisierten conjunktivalen Epithelzellreihe IOBA-NHC, den sie jedoch durch eine erhöhte Proliferationsrate dieser Zellen

erklären.¹³⁰ Natürlich hat die erhöhte Proliferation der immortalisierten Keratozyten einen Einfluss auf diese Ergebnisse, doch sind entsprechende Ergebnisse ja auch bei den normal proliferierenden primären Zellen zu finden. Der Aussage von Kasper et al.²³ kann daher nicht zugestimmt werden. Trotzdem sollte dieses unerwartete Ergebnis kritisch gesehen werden.

Es ist erstaunlich, dass es bis jetzt nur sehr wenige Studien zu Cetrimid an Hornhautzellen gibt. Weitere Analysen mit genauer statistischer Analyse müssen folgen, um Wirkunterschiede insbesondere durch niedrige Konzentrationen im Hinblick auf das Proliferationsverhalten zu erforschen.

Letzlich sind beide Substanzen insbesondere auf lange Sicht und bei häufigem täglichen Gebrauch schädlich für die Tränenfilmstabilität und die Hornhaut. Es ist daher überraschend, dass trotz der bekannten zytotoxischen Wirkung von quartären Ammoniumverbindungen diese immer noch in ihren besonders toxischen Konzentrationen in Augentropfen verwendet werden. Es sollten deshalb möglichst unkonservierte Einmaldosis-Produkte (EDO) verwendet werden, um von vornherein eine Gefährdung auszuschließen.

5.5 HCKi – ein guter Ersatz für primäre Keratozyten?

Das Ziel der vorgestellten Arbeit war insbesondere der Vergleich primärer und der neu entwickelten immortalisierten Keratozyten im Hinblick auf einen möglichen Ersatz primärer Zellen zu Studienzwecken. Auch stellte sich die Frage, ob HCKi den seit den vierziger Jahren verwendeten Draize-Test bald ersetzen und somit Tierversuche ersparen können.

Die Verwendung von immortalisierter Keratozyten in Studien bietet einige Vorteile. Die Zellen sind einfach zu kultivieren, anspruchsarm und liefern gut reproduzierbare Ergebnisse im Sinne einer guten Zellkultur-Homogenität bzw. -Standardisierung. Jedoch muss beachtet werden, dass HCKp und HCKi auch deutliche Unterschiede im Erscheinungsbild, Proliferationsverhalten und letztlich auch in ihrer Reaktion auf Substanzen aufweisen. Zorn-Kruppa et al. haben ebenfalls festgestellt, dass die immortalisierten Keratozyten sehr viel stärker unter normalen Bedingungen proliferieren als HCKp.^{67,68} Bei zwei von drei getesteten Substanzen waren beide Zellreihen in ihrer Sensitivität auf die Substanzen vergleichbar. Daher sehen Zorn-Kruppa et al. in den HCKi einen guten Ersatz für primäre Zellen.⁶⁷

In der hier vorgestellten Arbeit entsprachen die Ergebnisse beider Zellreihen nur in einem von zwei Fällen einander. So konnte bei der Untersuchung der mit BAC behandelten Zellen bei beiden Zellreihen keine Toxizität mehr ab einer Konzentration von =0,4µg/ml festgestellt

werden. Bei Behandlung mit Cetrimid hingegen war eine Toxizität bei HCKi bereits ab einer Konzentration von 0,1µg/ml, bei HCKp jedoch erst ab einer Konzentration von =0,01µg/ml nicht mehr nachweisbar. Dies spricht für eine stärkere Widerstandsfähigkeit der HCKi bei erhöhter Proliferationskapazität und somit auch erhöhter Regenerationsfähigkeit. Diese Unterschiede spiegeln sich natürlich wie bereits beschrieben auch in der Vitalität wieder (Kap. 5.2).

Der Meinung von Zorn-Kruppa et al. kann daher nur teilweise zugestimmt werden. Da man bedenken muss, dass die in dieser Arbeit detektierten Konzentrationsunterschiede nur in einem Bereich von einer Zehnerpotenz liegen, können HCKi auf jeden Fall insbesondere in Vorversuchen zum Feststellen von zum Beispiel Toxizitätsgrenzen zum Einsatz kommen. Hierdurch würde ein großer Teil primärer Zellen eingespart werden, die zum einen schwer bzw. langsam zu kultivieren und auch von Hornhaut zu Hornhaut ziemlich heterogen sind. Somit könnte der Draize-Test und Versuche mit primären Zellen auf ein Mindestmaß reduziert werden. Wichtig ist, dass man sich beim Gebrauch der HCKi in Studien der Unterschiede, insbesondere im Hinblick auf Proliferationskapazität und Widerstandskraft, beider Zellreihen bewusst ist. Ganz ersetzen können HCKi primäre Zellen jedoch nicht.

5.6 HCKi und der Aufbau eines Hornhaut-Konstruktes

Viele Arbeitsgruppen verwenden bei der Entwicklung eines künstlichen humanen Cornea-Äquivalentes zwar immortalisierte Epithel- und Endothelzellen, jedoch native Keratozyten.^{73,74} Daher stellte sich die Frage, ob HCKi beim Aufbau einer künstlichen Cornea verwendet werden können bzw. sollten.

Griffith et al.⁷² und Zorn-Kruppa et al.⁶⁸ haben bereits Hornhaut-Konstrukte, die vollständig aus immortalisierten Zellen bestehen, etabliert. Da alle immortalisierten Zellen eine erhöhte Proliferation aufweisen,^{62,64,67,68,127} stellt die erhöhte Proliferationskapazität der HCKi eigentlich kein Problem hierfür dar. Jedoch muss man beachten, dass die Anzahl der Keratozyten in vivo nur einem Bruchteil der Epithel- oder Endothelzellen entspricht und daher eine Störung des empfindlichen Gleichgewichtes mit darauf folgendem Transparenzverlust entstehen kann. Die etablierten Äquivalente sind transparent und entsprechen laut Arbeitsgruppen im Querschnitt der humanen Cornea im Aufbau und Erscheinungsbild. Allerdings fehlen momentan diesbezüglich Langzeitversuche, die eine Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichtes sichern. Desweiteren ist es unwahrscheinlich, dass diese Konstrukte beim Menschen als Hornhauttransplantate zum Einsatz kommen können. Der Trend geht eher zur Entwicklung einer künstlichen Polymer-Cornea.⁷⁶

6. ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahren hat die Entwicklung immortalisierter Zellreihen einen wichtigen Platz in der Forschung, mit dem Ziel einer zunehmenden Standardisierung, eingenommen. Primäre Hornhautzellen sind aufgrund eines nur langsamen Wachstums und einer relativ kurzen Lebensspanne bei insgesamt hoher Kulturheterogenität in vitro schwer zu kultivieren. Daher könnten insbesondere Studien zur Prüfung pharmazeutischer sowie kosmetischer Produkte von immortalisierten Zellreihen aufgrund ihrer einfachen Kultivierung und einer besseren Vergleichbarkeit profitieren. Auch im Hinblick auf die Entwicklung eines in vitro Cornea-Äquivalentes, stellt die hier vorgelegte Studie einen wichtigen Beitrag dar. Da die Zellreihe der immortalisierten Keratozyten (HCKi) eine neue Entwicklung darstellt, war das primäre Ziel der vorgelegten Arbeit der Vergleich primärer Keratozyten (HCKp) mit HCKi im Hinblick auf ihr Proliferations- und Toxizitätsverhalten. Desweiteren wurde die Frage beantwortet, ob immortalisierte Keratozyten in Studien als Ersatz für primäre Zellen sowie für den Draize-Test zum Einsatz kommen sollten. Dies wurde anhand der am häufigsten verwendeten Konservierungsstoffe, deren zytotoxische Wirkung ebenfalls evaluiert wurde, in Augentropfen realisiert. Die vorgelegte Arbeit ist nach bestmöglicher Literaturrecherche die bislang Zweite, die HCKp mit HCKi anhand von Zytotoxizitätstests vergleicht.

Isolierte HCKp und HCKi wurden hierfür kultiviert und dann nach einer Adhärenzphase von 24 Stunden mit BAC und Cetrimid (40-0,1µg/ml bzw. 100-0,01µg/ml) für 72 Stunden versetzt. Für die Kontrollgruppen wurden die Zellen mit dem jeweiligen Keratozytenmedium versetzt und ebenfalls inkubiert. Eine qualitative und quantitative Auswertung der Zellen erfolgte unter dem Mikroskop bzw. mit einem Zellcounter. Es wurden die Zellzahl und die Vitalität der Zellen unter Berücksichtigung der Verdopplungszeit eruiert. Mittels eines TUNEL-Assays mit Hämatoxylin-Gegenfärbung und eines Annexin-V-Propidiumiodid-Fluorescein-Kits wurde der Anteil apoptotischer Zellen bestimmt.

Bereits während der Kultivierung zeigten sich deutliche Unterschiede beider Zellreihen im Hinblick auf ihre Morphologie, Proliferationsrate und ihre Verdopplungszeit. Im Gegensatz zu primären Zellen waren die HCKi dichter angeordnet durch einen Verlust der Zellkontakthemmung, wobei sie kleiner und in ihrer Form rundlicher waren und eine Focusbildung aufwiesen. Außerdem fiel im Gegensatz zu HCKp eine erhöhte Proliferationsrate auf. Dementsprechend kürzer war auch die Verdopplungszeit der HCKi mit etwa 30-34 Stunden im Gegensatz zu ca. 43-58 Stunden bei primären Keratozyten. Für einen direkten Vergleich

beider Zelllinien im Hinblick auf ihre Reaktion auf BAC und Cetrimid wurden die Zellen gleichgesetzt, um diesen von Beginn an bekannten Unterschied möglichst auszugleichen.

Bei Behandlung mit BAC waren in den Konzentrationen 40-4 μ g/ml sowie bei Cetrimid 100-10 μ g/ml keine vitalen Zellen mehr nachweisbar. Mittels Annexin-V- und TUNEL-Assay wurden hier Nekrosen gezeigt. Bei den mit BAC behandelten Keratozyten wurde ab einer Konzentration von =0,4 μ g/ml die Kontrollzellzahl bei beiden Zelllinien erreicht. Hierbei erreichten die primären Zellen die Kontrolle zwar, die HCKi zeigten jedoch einen signifikanten Anstieg der Zellzahl, bei 0,2 μ g/ml z.B. auf Werte von 232%, im Vergleich zur Kontrolle. Auch die Vitalität war bei den primären im Gegensatz zu den immortalisierten Keratozyten bis zu einer Konzentration von 0,1 μ g/ml signifikant herabgesetzt. BAC scheint in geringen Konzentrationen proliferativ zu wirken, da die Verdopplungszeit bei beiden Zellreihen sich verkürzte, bei HCKp nur tendenziell, bei HCKi signifikant.

Bei den mit Cetrimid behandelten Keratozyten zeigten beide Zellreihen einen hochsignifikanten Abfall der Zellzahl, wobei im Gegensatz zu HCKp bei den HCKi bereits ab = 0,1 μ g/ml kein statistischer Unterschied im Vergleich zur Kontrolle festgestellt wurde. Hierbei war auch die Vitalität signifikant herabgesetzt, bei den HCKp sowohl bei 1 μ g/ml als auch bei 0,01 μ g/ml, hier jedoch nur mit knapper Signifikanz. Im Gegensatz dazu war die Vitalität bei den HCKi nur bei 1 μ g/ml signifikant herabgesetzt. Die Verdopplungszeit war bei beiden Zelllinien hochsignifikant verlängert, wobei kein statistischer Unterschied zur Kontrolle bei HCKi ab =0,1 μ g/ml, bei HCKp jedoch erst ab 0,01 μ g/ml detektiert wurde.

In den Konzentrationen 0,4-0,1 μ g/ml BAC bzw. 1-0,01 μ g/ml Cetrimid wurden einer Kontrollpopulation entsprechende Apoptoseraten detektiert. Von einer quantitativen Auswertung wurde daher abgesehen.

HCKi sind insbesondere für Vorversuche zur Festlegung von Toxizitätsgrenzen in Studien geeignet. Hierdurch kann der Gebrauch von HCKp und Tierversuchen auf ein Mindestmaß reduziert werden. Ganz ersetzen können sie primäre Zellen aber nicht, da sich zwischen beiden Zelllinien auch deutliche Unterschiede in Morphologie, Proliferationsverhalten und Sensitivität auf toxische Substanzen zeigten. HCKi weisen eine stärkere Widerstandsfähigkeit und eine erhöhte Regenerationsfähigkeit im Gegensatz zu HCKp auf. Erstaunlich war die in geringen Konzentrationen proliferative Wirkung von BAC im Gegensatz zu Cetrimid und der Mangel an apoptotischen Zellen. Weitere Studien müssen daher folgen. Für die Entwicklung eines Cornea-Konstruktes sind bis jetzt fehlende Langzeitstudien nötig, da die HCKi durch ihre erhöhte Proliferation das empfindliche Transparenz-Gleichgewicht auf lange Sicht stören könnten.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. **Seiler T.** Über die Transparenz der Kornea. *Fortschr Ophthalmol* 1987; 84: 115-117.
2. **Kühnel W, Mendoza AS.** Morphologie der Cornea. *Fortschr Ophthalmol* 1987; 84: 217-224.
3. **Lang GK.** *Augenheilkunde*. Georg Thieme Verlag Stuttgart/ New York 2004; 121-124.
4. **Kanski JJ.** *Klinische Ophthalmologie. Lehrbuch und Atlas.* Urban&Fischer München/Jena 2008; 254.
5. **Maurice DM.** The structure and transparency of the cornea. *J Physiol* 1957; 136: 263-286.
6. **West-May JA, Dwivedi DJ.** The keratocyte: Corneal stromal cell with variable repair phenotypes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2006; 38: 1625-1631.
7. **Fini ME.** Keratocyte and Fibroblast Phenotypes in the Repairing Cornea. *Progress in Retinal and Eye Research* 1999; 18: 529-551.
8. **Thieme H.** Medikamentöse Glaukomtherapie. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2006; 223: R73-R83.
9. **Noecker RJ, Herrygers LA, Anwaruddin R.** Corneal and conjunctival changes caused by commonly used glaucoma medications. *Cornea* 2004; 23: 490-496.
10. **Garweg JG.** Zur Behandlungsstrategie bei chronischer endogener Uveitis. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2007; 224: 367- 372.
11. **Brewitt H, Kaercher T, Rüfer F.** Trockenes Auge und Blepharitis. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2008; 225: R15-R36.
12. **Knop E, Knop N, Brewitt.** Das trockene Auge als komplexe Fehlregulation der funktionellen Anatomie der Augenoberfläche. *Der Ophthalmologe* 2003; 100: 917-928.
13. **Battat L, Macri A, Dursun D, Pflugfelder SC.** Effects of laser in situ keratomileusis on tear production, clearance, and the ocular surface. *Ophthalmology* 2001; 108: 1230-1235.
14. **Quinto GG, Camacho W, Behrens A.** Postrefractive surgery dry eye. *Current Opinion in Ophthalmology* 2008; 19: 335-341.
15. **Nejima R, Miyata K, Tanabe T et al.** Corneal barrier function, tear film stability, and corneal sensation after photorefractive keratotomy and laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol* 2005; 139: 64-71.
16. **XU KP, Yagi Y, Tsubota K.** Decrease in corneal sensitivity and change in tear function in dry eye. *Cornea* 1996; 15: 235-239.
17. **Göbbels M, Spitznas M.** Corneal epithelial permeability of dry eyes before and after treatment with artificial tears. *Ophthalmology* 1992; 99: 873-878.

18. **Sasaki H**, Nagano T, Yamamura K, Nishida K, Nakamura J. Ophthalmic preservatives as absorption promoters for ocular drug delivery. *J Pharm Pharmacol* 1995; 47: 703-707.
19. **Gassett AR**, Ishii Y, Kaufman HE, Miller T. Cytotoxicity Of Ophthalmic Preservatives. *Am J Ophthalmol* 1974; 78: 98-105.
20. **Debbasch C**, Brignole F, Pisella PJ, Warnet JM, Rat P, Baudouin C. Quaternary Ammoniums and Other Preservatives' Contribution in Oxidative Stress and Apoptosis on Chang Conjunctival Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:642-652.
21. **Neville R**, Dennis P, Sens D, Crouch R. Preservative cytotoxicity to cultured corneal epithelial cells. *Curr Eye Res* 1986; 5: 367-372.
22. **Tripathi BJ**, Tripathi RC, Kolli SP. Cytotoxicity of ophthalmic preservatives on human corneal epithelium. *Lens Eye Toxic Res* 1992; 9:361-375.
23. **Kasper K**, Kremling C, Geerling G. Toxizität neuer Benetzungs- und Konservierungsmittel in vitro. *Ophthalmologe* 2008; 105: 557-562.
24. **Labbé A**, Pauly A, Liang H et al. Comparison of Toxicological Profiles of Benzalkonium Chloride and Polyquaternium-1: An Experimental Study. *J Ocul Pharmacol Ther* 2006; 22: 267-278.
25. **López Bernal D**, Ubels JL. Quantitative evaluation of the corneal epithelial barrier: effect of artificial tears and preservatives. *Curr Eye Res* 1991; 10:645-656.
26. **Geier DA**, Sykes LK, Geier MR. A Review of Thimerosal (Merthiolate) and its Ethylmercury Breakdown Product: Specific Historical Considerations Regarding Safety and Effectiveness. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 2007; 10: 575-596.
27. **Tosti A**, Tosti G. Thimerosal: a hidden allergen in ophthalmology. *Contact Dermatitis* 1988; 18: 268-273.
28. **Wantke F**. Thimerosal induces toxic reactions. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; 105: 408.
29. **Asbell PA**. Increasing importance of dry eye syndrome and the ideal artificial tear: consensus views from a roundtable discussion. *Curr Med Res Opin* 2006; 22: 2149-2147.
30. **Rieck PW**, Sherif ZA-R, Hartmann C, Pleyer U. Wundheilung der Hornhaut Teil I: Biologische Grundlagen und ihre klinische Relevanz. *Ophthalmologe* 2003; 100: 749-770.
31. **Bettelheim FA**, Plessy B. The hydration of proteoglycans of bovine cornea. *Biochem Biophys Acta* 1975; 383: 203-214.
32. **Müller LJ**, Pels E, Vrensen GFJM. The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 437-443.
33. **Maurice DM**. Clinical physiology of the cornea. *Int Ophthalmol Clin* 1962; 2: 561-572.

34. **Müller LL**, Pels E, Schurmanns LRHM, Vrensen GFJM. A new three-dimensional model of the organization of proteoglycans and collagen fibrils in the human corneal stroma. *Experimental Eye Research* 2004; 78: 493-501.
35. **Jester JV**, Moller-Pedersen T, Huang J et al. The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins'. *Journal of Cell Science* 1999; 112: 613-622.
36. **Ivarsen A** Laurberg T, Moller-Pedersen T. Role of Keratocyte Loss on Corneal Wound Repair after LASIK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 3499-3506.
37. **Wilson SE**, He YG, Weng J, Li Q, Vital M, Chwang EL. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization. *Exp Eye Res* 1996; 62: 325-338.
38. **Mohan RR**, Liang Q, Kim WJ, Helena MC, Baerveldt F, Wilson SE. Apoptosis in the cornea: further characterization of Fas/Fas ligand system. *Exp Eye Res* 1997; 65: 575-589.
39. **Jalbert I**, Stapleton F. The corneal stroma during contact lens wear. *Contact Lens & Anterior Eye* 2005; 28: 3-12.
40. **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. *Progress in Retinal and Eye Research* 2001; 20: 625-637.
41. **Zhao J**, Nagasaki T, Maurice DM. Role of Tears in Keratocyte Loss after Epithelial Removal in Mouse Cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 1743-1749.
42. **Wilson SE**, Liu JJ, Mohan RR. Stroma-Epithelial Interactions in the Cornea. *Progress in Retinal and Eye Research* 1999; 18: 293-309.
43. **Tuominen I**, Vesaluoma M, Teppo AM, Gronhagen-Riska C, Tervo T. Soluble Fas and Fas ligand in human tear fluid after photorefractive keratectomy. *Br J Ophthalmol* 1999; 83: 1360-1363.
44. **Gupta A**, Monroy D, Ji Z, Yoshino K, Huang A, Pflugfelder SC. Transforming growth factor beta-1 and beta-2 in human tear fluid. *Curr Eye Res* 1996; 15: 605-614.
45. **Sivak JM**, Fini ME. MMP's in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. *Prog Retin Eye Res* 2002; 21: 1-14.
46. **Funderburgh JL**, Funderburgh ML, Mann MM, Corpuz L, Roth MR. Proteoglycan Expression during Transforming Growth Factor β -induced Keratocyte-Myofibroblast Transdifferentiation. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 47: 44173-44178.
47. **West-Mays JA**, Strissel KJ, Sadow PM, Fini ME. Competence for collagenase gene expression by tissue fibroblasts requires activation of an interleukin 1 alpha autocrine loop. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1995; 92: 6768-6772.

48. **Maltseva O**, Folger P, Zekaria D, Petridou S, Masur Sk. Fibroblast growth factor reversal of the corneal myofibroblast phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 2490-2495.
49. **Lande MA**, Birk DE, Nagpal ML, Rader RL. Phagocytic properties of human keratocyte cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981; 20: 481-489.
50. **Chakravarti S**, Wu F, Vij N, Roberts L, Joyce S. Microarray Studies Reveal Makrophage-Like Funktionen of Stromal Keratocytes in the Cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 3475-3484.
51. **Jester JV**, Petroll WM, Cavanagh HD. Corneal stromal wound healing in refractive surgery : the role of myofibroblasts. *Prog Retin Eye Res* 1999; 18: 311-356.
52. **Pei Y**, Sherry DM, McDermott AM. Thy-1 distinguishes human corneal fibroblasts and myofibroblasts from keratocytes. *Experimental Eye Research* 2004; 79: 705-712:
53. **Beales MP**, Funderburgh JL, Jester JV, Hassel JR. Proteoglycan Synthesis by Bovine Keratocytes and Corneal Fibroblasts: Maintenance of the Keratocyte Phenotype in Culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:1658-1663.
54. **Musselmann K**, Alexandrou B, Kane B, Hassel JR. Maintenance of Keratocyte Phenotype during Cell Proliferation Stimulated by Insulin. *The Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 32634-32639.
55. **Masur SK**, Dewal HS, Dinh TT, Erenburg I, Petridou S. Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc Natl Acad Sci (USA)*1996; 93: 4219-4223.
56. **Berryhill BL**, Kader R, Kane B, Birk DE, Feng J, Hassel JR. Partial restoration of the keratocyte phenotype to bovine keratocytes made fibroblastic by serum. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 3416-3421.
57. **Draize JH**, Woodard G, Calvery HO. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucus membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 1944; 82: 377-390.
58. **Manfredi JJ**, Prives C. The transforming activity of simian virus 40 large tumor antigen. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1198: 65-83.
59. **Araki K**, Ohashi Y, Sasabe T et al. Immortalisation of Rabbit Corneal Epithelial Cells by a Recombinant SV40-Adenovirus Vector. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 18:2665-2671.
60. **Feldman S**, Gately D, Chien KR, Feramisco JR. Expression of SV40 Virus large T Antigen by Recombinant Adenoviruses Activates Proliferation of Corneal Endothelium In Vitro. *J Clin Invest* 1993; 9: 1713-1720.
61. **Kahn CR**, Young E, Lee IH, Rhim JS. Human Corneal Epithelial Primary Cultures and Cell Lines With Extended Life Span: In Vitro Model for Ocular Studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34: 3429-3441.

62. **Wilson SE**, Lloyd SA, He YG, McCash CS. Extended Life of Human Corneal Endothelial Cells Transfected With the SV40 Large T Antigen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34: 2112-2123.
63. **Araki-Sasaki K**, Ohashi Y, Sasabe T et al. An SV40-Immortalized Human Corneal Epithelial Cell Line and Its Characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36: 614-621.
64. **Bednarz J**, Teigel M, Friedl P, Engelmann K. Immortalization of human corneal endothelial cells using electroporation protocol optimized for human corneal endothelial and human retinal pigment epithelial cells. *Acta Ophthalmol Scand* 2000; 78: 130-136.
65. **Barry-Lane PA**, Wilson SE, Cavanagh HD, Petroll WM, Jester JV. Characterization of SV40-Transfected Cell Strains from Rabbit Keratocytes. *Cornea* 1997; 16: 72-78.
66. **Jester JV**, Huang J, Fisher S et al. Myofibroblast Differentiation of Normal Human Keratocytes and hTERT, Extended-Life Human Corneal Fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 1850-1858.
67. **Zorn-Kruppa M**, Tykhonova S, Belge G, Diehl HA, Engelke M. Comparison of Human Corneal Cell Cultures in Cytotoxicity Testing. *Altex* 2004; 21:129-134.
68. **Zorn-Kruppa M**, Tykhonova S, Belge G, Bednarz J, Diehl HA, Engelke M. A Human Corneal Equivalent Constructed from SV40-immortalised Corneal Cell Lines. *ATLA* 2005; 33: 37-45.
69. **Germain L**, Carrier P, Auger FA, Salesse C, Guérin SL. Can We Produce a Human Corneal Equivalent by Tissue Engineering? *Progress in Retinal and Eye Research* 2000; 19: 497-527.
70. **Minami Y**, Sugihara H, Oono S. Reconstruction of Cornea in Three-Dimensional Collagen Gel Matrix Culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993 ; 34 : 2316-2324.
71. **Parnigotto PP**, Bassani V, Montesi F, Coconi MT. Bovine corneal stroma and epithelium reconstructed in vitro: characterisation and response to surfactants. *Eye* 1998; 12: 304-310.
72. **Griffith M**, Osborne R, Munger R et al. Functional Human Corneal Equivalents Constructed from Cell Lines. *Science* 1999; 286: 2169-2172.
73. **Reichl S**, Bednarz J, Müller-Goymann CC. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. *Br J Ophthalmol* 2004; 88: 560-565.
74. **Reichl S**, Döhring S, Bednarz J, Müller-Goymann CC. Human cornea construct HCC- an alternative for in vitro permeation studies? A comparison with human donor corneas. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2005; 60: 305-308.
75. **Alaminos M**, Sanchez-Quevedo MDC, Munos-Ávila JI et al. Construction of a Complete Rabbit Cornea Substitute using a Fibrin-Agarose Scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 3311-3317.

76. **Kobuch KA**, Storsberg J, Herrmann WA et al. Towards an Artificial Cornea: Evaluation of a New Designed Hydrophobic One-Material Implant With Modified Surfaces in vitro and in vivo. ARVO Abstract 5706, 2008.
77. **Prince SJ**, McLaury HJ, Allen LV, McLaury P. Analysis of benzalkonium chloride and its homologs: HPLC versus HPCE. *J Pharm Biomed Anal* 1999; 19:877-882.
78. **Rote Liste**. Herausgeber und Verlag. Frankfurt/Main. 2008.
79. **Debbasch C**, de Saint Jean M, Pisella PJ, Rat P, Warnet JM, Baudouin C. Cytotoxicité des ammoniums quaternaires sur une lignée de cellules conjonctivales humaines. *J Fr Ophthalmol* 1999; 22: 950-958.
80. **Grant RL**, Acosta D. Prolonged adverse effects of benzalkonium chloride and sodium dodecyl sulfate in a primary culture system of rabbit corneal epithelial cells. *Fund Appl Toxicol* 1996; 33: 71-82.
81. **Patarca R**, Rosenzweig JA, Zuniga AA, Fletcher MA. Benzalkonium salts: effects on G protein-mediated processes and surface membranes. *Crit Rev Oncol* 2000; 11: 255-305.
82. **Green K**, Tonjum A. Influence of various agents on corneal permeability. *Am J Ophthalmol* 1971; 72: 897-905.
83. **Cha SH**, Lee JS, Oum BS, Kim CD. Corneal epithelial cellular dysfunction from benzalkonium chloride (BAC) in vitro. *Clinical and Experimental Ophthalmology* 2004; 32: 180-184.
84. **Eleftheriadis H**, Cheong M, Sandeman S et al. Corneal toxicity secondary to inadvertent use of benzalkonium chloride preserved viscoelastic material in cataract surgery. *Br J Ophthalmol* 2002; 86: 299-305.
85. **Liu H**, Routley I, Teichmann KD. Toxic endothelial cell destruction from intraocular benzalkonium chloride. *J Cataract Refract Surg* 2001; 27: 1746-1750.
86. **Friedlaender MH**, Breshears D, Amoozgar B, Sheardown H, Senchyna M. The dilution of benzalkonium chloride (BAK) in the tear film. *Adv Ther* 2006; 23: 835-841.
87. **Ichijima H**, Petroll WM, Jester JV, Cavanagh HD. Confocal microscopic studies of living rabbit cornea treated with benzalkonium chloride. *Cornea* 1992; 11: 221-225.
88. **Kuppens EV**, de Jong CA, Stolwijk TR, de Keizer RJ, van Best JA. Effect of timolol with and without preservative on the basal tear turnover in glaucoma. *Br J Ophthalmol* 1995; 79: 339-342.
89. **Chiambaretta F**, Pouliquen P, Rigal D. Allergie et conservateurs. A propos de trois cas d'allergie au chlorure de benzalkonium. *J Fr Ophthalmol* 1997; 20: 8-16.
90. **Fagron**. Prüfzertifikat für Cetrimid. 2005.

91. **GESTIS- Stoffdatenbank.** Gefahrenstoffinformationssystem der gewerblichen Berufsgenossenschaften. Cetyltrimethylammoniumbromid. 2008.
[http:// biade.itrust.de/biade/lpext.dll?f=templates&fn=main-hit-h.htm&2.0](http://biade.itrust.de/biade/lpext.dll?f=templates&fn=main-hit-h.htm&2.0)
92. **Kerr JF,** Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basis biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
93. **Böhm I,** Träber F, Block W, Schild H. Molekulare Bildgebung von Apoptose und Nekrose - zellbiologische Grundlagen und Einsatz in der Onkologie. *Fortschr Röntgenstr* 2006; 178: 263-271.
94. **Häcker G.** Die Physiologie des Zelltods. *Med Welt* 1999; 50: 294-301.
95. **Majno G,** Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. *Am J Pathol* 1995; 146: 3-15.
96. **Wyllie AH.** Apoptosis: an overview. *British Medical Bulletin* 1997; 53: 451-465.
97. **Wilson SE,** Li Q, Weng J et al. The Fas/Fas ligand system and other modulators of apoptosis in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 1582-1592.
98. **Buron N,** Micheau O, Cathelin S, Lafontaine P-O, Creuzot-Garcher C, Solary E. Differential Mechanisms of Conjunctival Cell Death Induction by Ultraviolet Irradiation and Benzalkonium chloride. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 4221-4230.
99. **Yuan JY.** Transducing signals of life and death. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 2: 247-251.
100. **Ravagnan L,** Roumier T, Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol* 2002; 192: 131-137.
101. **Boatright KM,** Renshaw M, Scott FL et al. A unified model for apical caspases activation. *Mol Cell* 2003; 11: 529-541.
102. **Adams JM,** Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-1326.
103. **Scaffidi C,** Schmitz I, Zha J, Korsmeyer SJ, Krammer PH, Peter ME. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and II cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 22532-22538.
104. **van Gurp M,** Festjens N, van Loo G, Saelens X, Vandenabeele P. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 487-497.
105. **Nicotera P,** Leist M, Ferrando-May E. Apoptosis and Necrosis: different execution of the same death. *Biochem Soc Symp* 1999; 66: 69-73.
106. **Hartmann C,** Rieck P. A New Test for Endothelial Viability. The Janus Green Photometry Technique. *Arch Ophthalmol* 1989; 107: 1511-1515.

107. **Rieck P**, Peters D, Hartmann C, Courtois Y. A New, Rapid Colorimetric Assay for Quantitative Determination of Cellular Proliferation, Growth Inhibition, and Viability. *J Tiss Cult Meth* 1993; 15: 37-42.
108. **Lindl T**. Zelle- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. Heidelberg, Berlin: Spektrum, Akad Verl 2002; 214-257.
109. **van England M**, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutlingsperger CPM. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* 1996; 24: 131-139.
110. **Negoescu A**, Lorimier P, Labat-Moleur F et al. In Situ Apoptotic Cell Labeling by the TUNEL Method: Improvement and Evaluation on Cell Preparations. *J Histochem Cytochem* 1996; 44: 959-968.
111. **Wilson SE**, Chaurasia SS, Medeiros FW. Apoptosis in the initiation, modulation and termination of the corneal wound healing response. *Exp Eye Res* 2007; 85: 305-311.
112. **Bourcier T**, Rondeau N, Paquet S, et al. Expression of Neurotensin Receptors in Human Corneal Keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:1765-1771.
113. **Borderie VM**, Mourra N, Laroche L. Influence of fetal calf serum, fibroblast growth factor in three-dimensional cultures of human keratocytes in collagen gel matrix. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999; 237:861-869.
114. **Borderie VM**, Lopez M, Lombet A, Carvajal-Gonzalez S, Cywiner C, Laroche L. Cryopreservation and Culture of Human Corneal Keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39:1511-1519.
115. **Frankfurt OS**, Robb JA, Sugarbaker EV, Villa L. Monoclonal Antibody to Single-Stranded DNA Is a Specific and Sensitive Marker of Apoptosis. *Experimental Cell Research* 1996; 226: 387-397.
116. **Gavrieli Y**, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493-501.
117. **Van England M**, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutlingsperger CPM. Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphotidylserine exposure. *Cytometry* 1998; 13: 1-9.
118. **Kagan VE**, Fabisiak JP, Shedova AA et al. Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis. *FEBS Lett.* 2000; 477: 1-7.
119. **Roche Diagnostics**. Annexin-V-Fluos Staining Kit product information. 2005.
120. **Wilson SE**, Weng J, Blair S, He YG, Lloyd S. Expression of E6/E7 or SV40 large T antigen-coding oncogenes in human corneal endothelial cells indicates regulated high proliferative capacity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36: 32-40.

121. **de Saint Jean M**, Baudouin C, Di Nolfo M et al. Comparison of morphological and functional characteristics of primary-cultured human conjunctival epithelium and of Wong-Kilbourne derivative of Chang conjunctival cell line. *Exp Eye Res* 2004; 78: 257-274.
122. **Diebold Y**, Calonge M, Enriquez de Salamanca A et al. Characterization of a spontaneously immortalized cell line (IOBA-NHC) from normal human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 4263-4274.
123. **Dropcova S**, Denyer SP, Lloyd AW et al. A Standard Strain of Human Ocular Keratocytes. *Ophthalmic Res* 1999; 31: 33-41.
124. **McInnis KA**, Britain A, Lausch RN, Oakes JE. Synthesis of α -Chemokines IP-10, I-TAC, and MIG Are Differentially Regulated in Human Corneal Keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: 1668-1674.
125. **Wu KY**, Wang HZ, Hong SJ. Effects of Antiglaucoma Drugs on Cellular Proliferation in Cultured Human Corneal Keratocytes. *Kaohsiung J Med Sci* 2006; 22: 120-125.
126. **Hoffschir F**, Ricoul M, Lemieux N, Estrade S, Cassingena R, Dutrillaux B. Jumping translocations originate clonal rearrangements in SV40-transformed human fibroblasts. *Int J Cancer* 1992; 52: 130-136.
127. **Engelmann K**, Bednarz J, Valtink M. Prospects for endothelial transplantation. *Exp Eye Res* 2004; 78: 573-578.
128. **Chung SH**, Lee SK, Cristol SM et al. Impact of short-term exposure of commercial eyedrops preserved with benzalkonium chloride on precorneal mucin. *Mol Vis* 2006; 12: 415-421.
129. **Chang SW**, Chi RF, Wu CC, Su MJ. Benzalkonium Chloride and Gentamicin Cause a Leak in Corneal Epithelial Cell Membrane. *Exp Eye Res* 2000; 71: 3-10
130. **Brasnu E**, Brignole-Baudouin F, Riancho L, Warnet JM, Baudouin C. Comparative study on cytotoxic effects of benzalkonium chloride on the Wong-Kilbourne derivative of Chang conjunctival and IOBA-NHC cell lines. *Molecular Vision* 2008; 14: 394-402.
131. **Debbasch C**, Pisella PJ, De Saint Jean M, Rat P, Warnet JM, Baudouin C. Mitochondrial activity and glutathione injury in apoptosis induced by unpreserved and preserved beta-blockers on Chang conjunctival cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 2525-2533.
132. **de Saint Jean M**, Brignole F, Bringuier AF, Bauchet A, Feldmann G, Baudouin C. Effects of benzalkonium chloride on growth and survival of Chang conjunctival cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 619-630.
133. **Wu KY**, Wang HZ, Hong SJ. Effects of Antiglaucoma Drugs on Cellular Proliferation in Cultured Human Corneal Keratocytes. *Kaohsiung J Med Sci* 2006; 22: 120-125.

134. **van Ruissen F**, Le M, Carroll JM, van der Valk PGM, Schalkwijk J. Differential Effects of Detergents on Keratinocyte Gene Expression. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 358-363.
135. **Liang H**, Brignole-Baudouin F, Rabinovich-Gullatt L et al. Reduction of quaternary ammonium-induced ocular surface toxicity by emulsions : an in vivo study in rabbits. *Molecular Vision* 2008; 14: 204-216.
136. **Baudouin C**, Riancho L, Warnet JM, Brignole F. In Vitro Studies of Antiglaucomatous Prostaglandin Analogue: Travoprost with and without Benzalkonium Chloride and Preserved Latanoprost. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 4123-4128.
137. **Hamard P**, Blondin C, Debbasch C, Warnet JM, Baudouin C, Brignole F. In Vitro effects of preserved and unpreserved antiglaucoma drugs on apoptotic marker expression by human trabecular cells. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003; 241: 1037-1043.

8. VORABVERÖFFENTLICHUNGEN

Kagan L, Rieck P.

Vergleichende in vitro Toxizitätsanalyse von Konservierungsstoffen an primären und immortalisierten Keratozyten.

Vortrag auf dem Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG), Berlin, September 2008

Kagan L, Rieck P. A comparative in vitro toxicity analysis of preservatives in primary and immortalized keratocytes. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology (im Review-Verfahren)

Kagan L, Rieck P. Vergleichende in vitro Analyse von primären und immortalisierten Keratozyten. Der Ophthalmologe (akzeptiert am 22.06.2009)

9. DANKSAGUNG

Ganz besonders möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Peter Wolfgang Rieck für seine sehr gute und herzliche Betreuung danken. Für die viele Zeit, die er sich immer für mich genommen hat und die gern gegebenen Ratschläge und Aufmunterungen. Außerdem danke ich ihm für sein mir entgegengebrachtes Vertrauen hinsichtlich der Vorstellung meiner Dissertationsergebnisse auf dem diesjährigen DOG-Kongress und einer geplanten Publikation.

Desweiteren möchte ich mich beim Augen-Forschungsteam des CVK bedanken:

Bei Frau S. Metzner, die mich in die Welt der Labor-Methodik eingeführt und durch Höhen und Tiefen begleitet hat. Die immer einen Ratschlag parat hatte und für mich da war.

Bei Herr PD Dr. E. Knop, der mich in den Gebrauch des Fluoreszenzmikroskopes eingewiesen hat.

Bei Herrn Dr. S. Mergler, der stets hilfsbereit war, und es immer wieder geschafft hat, meinen PC-Account zu reaktivieren.

Außerdem danke ich der Arbeitsgruppe um Frau PD Dr. M. Engelke vom Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin, die mir die immortalisierte Keratozytenlinie HCKi zur Verfügung gestellt hat.

Besonderer Dank gebührt auch meiner Familie, meinen geliebten Eltern und meiner lieben Schwester, die mir stets den Rücken gestärkt und mir Alles im Leben ermöglicht haben.

10. LEBENSLAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich, Lionella Kagan, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Vergleichende in vitro Analyse von primären und immortalisierten Keratozyten anhand von Zytotoxizitätstests mit Konservierungsstoffen für Augentropfen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift