

## E. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, basierend auf einem bestehenden *in vitro* Modell der Rinderklaue wie es von NEBEL (2005) vorgestellt wurde, ein organotypisches Modell der Rinderklaue zu entwickeln und exemplarisch für experimentelle Untersuchungen einzusetzen. Damit sich ein *in vitro* Modell der Situation im lebenden Organismus annähert, muss es möglichst eng an die Bedingungen *in vivo* angepasst werden. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde hierfür nicht mit statischen Kulturen gearbeitet, sondern mit verschiedenen Perfusionsmodellen, die durch einen kontinuierlichen Nährstoffaustausch gekennzeichnet sind. Hierdurch konnte nicht nur die kontinuierliche Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen durch den Blutzustrom simuliert werden, sondern auch der sofortige Abtransport zellschädigender Stoffwechselprodukte der Zellen gewährleistet werden. Ein weiterer Vorteil dieser Perfusionsmodelle ist, dass über das perfundierende Medium der Zellkultur verschiedene Faktoren (z.B. Wachstumsfaktoren etc.) zugesetzt werden können, um die Wirkung dieser Stoffe an der entsprechenden Zellkultur zu dokumentieren. Die in dieser Arbeit vorgestellten Perfusionsmodelle sind ein geeignetes Werkzeug für Untersuchungen der Effekte bioaktiver Moleküle an Zellkulturen, sowie das Studium der Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zelltypen. So können beispielsweise dermoepidermale Signalwege weiter erforscht werden, der Einfluss von Wachstumsfaktoren und Zytokinen auf Zellen kann genauer verfolgt werden und die Beeinflussung verschiedener Zellarten durch parakrine Regulationsmechanismen beobachtet und dokumentiert werden. Entsprechende Untersuchungen sind wichtig, um die Pathogenese von nicht infektiösen Klauenerkrankungen, insbesondere der Klauenrehe besser verstehen zu können und um die Kenntnis dieser biologischen Prozesse an der Rinderklaue zu erweitern und zu verbessern (HENDRY et al., 2001).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden in fünf Schwerpunkten diskutiert. Im ersten Abschnitt soll die Notwendigkeit der Etablierung eines solchen *in vitro* Modells diskutiert werden. Im zweiten Abschnitt wird die Entwicklung des Modells bis zur endgültigen Einsatzfähigkeit erörtert. Im dritten Abschnitt soll diskutiert werden, ob mit den erzielten Ergebnissen dieser Arbeit die Funktion eines Perfusionsmodelles belegt werden konnte. Der vierte Teil soll Aufschluss über die praktische Anwendung dieses Systems geben, während im letzten Teil darauf eingegangen wird, welche tierartübergreifenden Anwendungsmöglichkeiten für dieses System bestehen.

## 1. Warum ein *in vitro* Modell der Rinderklaue?

Bisher weiß man generell nur sehr wenig über die Entwicklung von funktionellen Geweben mit ihren unterschiedlich differenzierten Zelltypen. Es besteht in der Humanmedizin eine sehr große Aktivität aber nur wenig Wissen auf diesem Gebiet (SCHUHMACHER et al., 2002). In Spezialgebieten der Veterinärmedizin, wie z.B. über Gewebekulturen der Rinderklaue, ist so gut wie nichts bekannt. Ziel dieser Arbeit sollte es sein, diese Lücke zu schließen und grundsätzliche Fragen zu beantworten. Mit der vorliegenden Arbeit wurden dreidimensionale Zellkonstrukte, die der Situation *in vivo* ähneln geschaffen. Es konnten verschiedene Faktoren an diesen Zellkonstrukten erfolgreich studiert und ausgewertet werden. Weiter sollte erreicht werden, bei den durchgeführten Isolierungen von bovinen Keratinozyten möglichst viele Stammzellen zu isolieren.

Aus embryonalen Stammzellen entstehen Vorläufer von Gewebezellen, die im Laufe der Entwicklung sozial agierende Verbände in einer speziellen Matrix entstehen lassen und schließlich Eigenschaften von adultem Gewebe annehmen (STREHL et al., 2002). Diese im Organismus wie selbstverständlich ablaufende Vorgänge werden durch eine Vielzahl von Mechanismen gesteuert und reguliert. So sind Prozesse wie die Adhäsion der Zellen an die extrazelluläre Matrix, die Steuerung des Zellzyklus über die Mitose und Interphase, die Wechselwirkung zwischen benachbarten Zellen, die Einwirkung von Hormonen sowie biophysikalische Einflüsse wie Druck, Flüssigkeitsbewegungen, Sauerstoffgehalt und Nährstoffangebot, Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Untersuchungen (STREHL et al., 2004; SCHUMACHER et al., 2002; MINUTH et al., 2004). In der aktuellen Literatur herrscht nach wie vor Uneinigkeit darüber, welchem dieser Prozesse die größte Bedeutung zukommt.

Verschiedene Studien haben die grundsätzliche Bedeutung der einzelnen Prozesse in der Differenzierung von Zellen für künstliches Gewebe belegt (MINUTH et al., 2004). Die natürliche Entwicklung der Zellen bedeutet das Erreichen einer optimalen Funktionalität in jedem der spezifischen Gewebe, bei der die Zellen und die dazugehörige extrazelluläre Matrix eine typische Differenzierung erlangen. In aktuellen Studien zur experimentellen Herstellung von künstlichem Gewebe sind interessante Fortschritte zu verzeichnen. Die Herstellung von künstlichem Gewebe wird in der Literatur mittlerweile als *tissue engineering* bezeichnet. Das Ziel des *tissue engineering* besteht im wesentlichen darin, die zum Erliegen gekommene körpereigene Regenerationsfähigkeit durch die Implantation lebender Zellen zu aktivieren und wenn nötig, beschädigte Gewebe durch Gewebeimplantate zu ersetzen (MINUTH et al., 2004). Dennoch sind zum Erreichen des eigentlichen Zieles *in vitro* eine optimale Funktionalität bestimmter Zellen, angepasst an deren Bedingungen *in vivo* zu

erzeugen, noch eine Vielzahl wissenschaftlicher Untersuchungen notwendig (MINUTH et al., 2004). Ein wichtiger Schritt ist die Entwicklung verbesserter Kulturmethoden, der dazugehörenden Untergründe (*Scaffolds*), auf denen die Zellen wachsen sollen, Mikroreaktoren und Medien, die an die jeweiligen Bedürfnisse optimal adaptiert werden und Bedingungen schaffen, die sich der Situation *in vivo* annähern (MINUTH et al., 2004). Aufgrund dieser Tatsachen sind mit den hier vorgestellten Perfusionsmodellen verschiedene Untergründe auf ihre Funktionalität erprobt worden und gleichzeitig mit unterschiedlichen Medien perfundiert worden, um ihren Einfluss auf das Wachstum boviner Keratinozyten zu erforschen.

Ethisch und auch wissenschaftlich fragwürdige, sowie kostenintensive Tierexperimente können durch diese modernen und gleichermaßen effizienten Methoden in Teilbereichen ersetzt werden. Die Zellen zum Aufbau einer Zellkultur können aus Schlachttieren isoliert und anschließend vermehrt werden, wodurch der Einsatz von Versuchstieren reduziert werden kann (SULTAN und HAAGSMANN, 2001).

In der humanmedizinischen Entwicklung von organotypischen Kultursystemen wurden in neuerer Zeit erhebliche Fortschritte erzielt und wesentliche Erkenntnisse durch den experimentellen Einsatz solcher Systeme gewonnen. In der Veterinärmedizin besteht hier noch Nachholbedarf. Es ist also notwendig, solche *in vitro* Systeme zu entwickeln und für Fragestellungen aus der Veterinärmedizin einzusetzen. Sie bieten die Möglichkeit, unter standardisierten und kontrollierbaren Bedingungen verschiedene Parameter an den entsprechenden Zellen zu erforschen.

Klauenerkrankungen waren in der Vergangenheit überwiegend Bestandteil klinischer Studien, oder histologischer bzw. morphologischer Untersuchungen gewesen. Die Entwicklung eines funktionstüchtigen Perfusionsmodelles, mit der Möglichkeit unter standardisierten Bedingungen und ohne die Beeinflussung des gesamten Organismus *in vivo* arbeiten zu können, bietet die Grundlage für neue Erkenntnisse in der Pathogenese von Klauenerkrankungen. So können z.B. einzelne Zusammenhänge, wie die Wirkung von Wachstumsfaktoren und verschiedenen Arzneimitteln auf das lebende Gewebe der Rinderklaue untersucht werden. Dermoepidermale Wechselwirkungen, die nur sehr schwierig zu beobachten, bzw. zu beurteilen sind, stehen immer öfter im Zentrum wissenschaftlicher Untersuchungen. Das Verständnis komplexer, die Hornqualität beeinflussender, dermoepidermaler Interaktionen und biologischer Prozesse in den Zellen der Rinderklaue, ist ein wichtiger Bestandteil wissenschaftlicher Fortschritte zum Thema Klauengesundheit. So können Hypothesen zur Pathogenese der Klauenrehe näher betrachtet werden, wie z.B. der

Einfluss von Matrixmetalloproteasen (MMP) (MÜLLING und LISCHER, 2002; TARLTON und WEBSTER, 2002), die Wirkung verschiedener Hormone (NEBEL, 2005), oder auch inflammatorische Prozesse, wie sie von HENDRY et al. (2001) beschrieben wurden.

Eine zentrale Frage in der aktuellen Literatur ist, ob die Klauenrehe ein entzündlicher Prozess ist oder nicht. Das hier vorgestellte Modell könnte wichtiger Bestandteil weiterer Studien zu dermoepidermalen Interaktionen sein und somit einen Beitrag in der Beantwortung dieser Frage leisten. So ist beispielsweise das Einwirken verschiedenen Entzündungsmediatoren auf ein Gewebekonstrukt von bovinen Keratinozyten und Fibrozyten sowie deren Effekte im definierten inflammatorischen Verlauf dokumentiert worden. Die vorliegenden Ergebnisse von HENDRY et al. (2001) konnten weitestgehend bestätigt werden.

## **2. Entwicklung des Systems**

Zu Beginn der Entwicklung dieses *in vitro* Systems der Rinderklaue stand die Isolierung der Zellen. Durch die Arbeit von NEBEL (2005) lag eine Methode zur Isolierung von bovinen Keratinozyten und Fibrozyten vor, die als Basis für die methodische Entwicklung der eigenen Arbeit verwendet werden konnte. Die im Rahmen der eigenen Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass mit der von NEBEL (2005) angewandten Methodik eine unkomplizierte Isolierung von Fibrozyten möglich ist, die Isolierung von Keratinozyten dagegen weitaus schwieriger ist. Um diesem Problem zu begegnen, wurde eine Methode erprobt, die von WUNN et al. (1999) zur Isolierung von Zellen aus Pferdehufen erfolgreich durchgeführt wurde. Diese Methodik wurde entsprechend den anatomischen Gegebenheiten der Rinderklaue angepasst. WUNN et al. (1999) verwendeten ein proteolytisches Enzym, die Dispase, für die Isolierung. Dieses Enzym besitzt die Fähigkeit, Loricrin in der Basalmembran des Klauengewebes aufzulösen und so eine Trennung von Dermis und Epidermis zu ermöglichen (WUNN et al., 1999). In den Vorversuchen wurde die optimale Einwirkzeit und Konzentration der Dispaselösung ermittelt, um zum einen die größtmögliche Zellzahl zu isolieren und zum anderen ein optimales Überleben der Zellen zu gewährleisten. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Geschwindigkeit des Verfahrens und der damit verbundene Erhalt der Zellvitalität. Die aus der Klaue gewonnenen Gewebeanteile (Gewebeblöckchen) können schnell mit Medium versorgt und gleichzeitig mit Antibiotika behandelt werden, um eine sekundäre bakterielle Kontamination und Schädigung der Vitalität der gewonnenen Zelllinie zu verhindern. Tatsächlich kam es bei der Zellisolierung nach der Methode von WUNN et al. (1999) nur bei einer von zehn Isolierungen zu einer bakteriellen

Kontamination und damit zum Verlust der isolierten Zellen. Bei der von NEBEL (2005) in kam es in drei von zehn Fällen zu einem Ausschluss der Zellen. Mit der enzymatischen Trennung von Dermis und Epidermis der Rinderklaue konnten weitaus mehr Keratinozyten in Reinkultur isoliert werden als mit der Methode von NEBEL (2005). Um die optimale Trennung von Dermis und Epidermis kontrollieren zu können, wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Diese Untersuchung verdeutlichte die selektive Auflösung der Basalmembran und belegte damit eine optimale spezifische Trennung von Dermis und Epidermis.

Bei der weiteren Kultivierung der isolierten Primärkulturen wurde nach Empfehlungen von MINUTH et al. (2000) und NEBEL (2005) serumhaltiges Medium verwendet, um ein schnelleres Wachstum der Zellen zu erreichen.

Das zunächst verwendete Perfusionskammersystem PCS3c der Firma Oligene (Berlin) wies erhebliche technische Defizite auf. So führten undichte Verbindungsstücke zwischen den Schlauchsystemen immer wieder zur Luftblasenbildung im Kammersystem, was eine Versorgung der Zellen mit Nährmedium an der Unterseite der Membran innerhalb der Perfusionskammer verhinderte und somit zum Absterben der Zellen führte. Durch den Einsatz von Schrumpfschläuchen aus der Elektrotechnik konnte eine Abdichtung des Systems und eine Vermeidung der für die Perfusion nachteiligen Luftblasen erreicht werden. Als ein weiterer Nachteil der von der Firma Oligene hergestellten Kammer wurde der hohe finanzielle Aufwand bei der Beschaffung der teuren und nur in großen Stückzahlen erhältlichen Millicell<sup>®</sup> Einsätze gewertet. Mit den für diese Kammer vorgesehenen preiswerteren Einsätzen aus Cellulosemischester konnten keine Zellen kultiviert werden. Die eigenen Versuche zeigten, dass die unzureichenden zelladhäsiven Eigenschaften dieses Einsatzes eine Anhaftung der isolierten Zellen und damit die Ausbildung eines konfluenten Zellrasens unmöglich machten. Mit diesem Einsatz konnten lediglich kleine Kolonien aus wenigen Zellen angezüchtet werden.

Die unbefriedigenden Ergebnisse beim Einsatz der kommerziell erhältlichen Kammersysteme und Einsätze erforderten die Überarbeitung dieser Systeme. So wurde nach Maßgabe der eigenen Erfahrungen im Rahmen dieser Arbeit ein neues, modifiziertes Kammersystem entwickelt, das sich durch eine einfachere Handhabung und eine zuverlässigere Anwendung auszeichnet. Es wurde ein Metallkammersystem sowie ein Acrylkammersystem entwickelt und anschließend in mehreren Durchgängen experimentell erprobt. Hierbei zeigte sich, dass mit den neu entwickelten Kammersystemen die Zelladhäsion und das Wachstum der isolierten Zellen optimiert werden konnten. Nach zehn Perfusionen mit diesen neu

entwickelten Kammern konnte belegt werden, dass die Anhaftung der Zellen an den verwendeten Untergründen (*Scaffolds*) sowie deren Wachstum nur auf einer Seite des eingesetzten Filtermaterials erfolgte. Eine Eigenschaft, die diese Kammersysteme für die Kultivierung organotypischer Gewebekulturen aus Keratinozyten prädisponiert, da die bovinen Fibrozyten an den hier verwendeten Filtermaterialien eine optimale Adhäsion zeigten.

Zur Kultivierung einer solchen organotypischen Gewebekultur wurde die Methode nach KOPPELSTÄTTER (2000) angewendet, wonach zunächst ein so genannter „*feeder layer*“ aus Fibrozyten geschaffen wurde. Die auf dem Filter anhaftenden Fibrozyten wurden vier Tage mit Medium und anschließend mit einer Mitomycin Lösung für zwei Stunden perfundiert. Mitomycin wird in der Zellkultur und auch in der humanen Tumorforschung eingesetzt, um die Mitoserate von schnell wachsenden Zellen zu hemmen bzw. vollständig zu unterbrechen. Nach Einwirken des Mitomycins zeigten die Fibrozyten für mehrere Tage kein Wachstum, blieben aber vital.

Auf den „*feeder layer*“ wurden Keratinozyten aus den eigenen Isolierungen ausgesät und deren Wachstum durch histologische/morphometrische Methoden ermittelt. Durch diese Methode konnte nicht nur eine bessere Anhaftung der Keratinozyten erreicht werden, sondern auch der Einfluss der durch Fibrozyten abgegebenen Stoffe auf die Keratinozyten erhöht werden. Von den zwei Kompartimenten der Perfusionskammern wurde im weiteren Verlauf jedoch nur mit dem jeweils oben liegenden weitergearbeitet. Das in den Vorversuchen angestrebte Ziel, die eingesetzten Filter als Basalmembranersatz zu benutzen, schlug insofern fehl, als die Zellen die auf der Unterseite angezüchtet wurden, durch den Perfusionsstrom in zehn von zwölf Versuchen weggeschwemmt wurden. Trotzdem wurde auch das untere Kompartiment mit Medium perfundiert, um den „*feeder layer*“ zusätzlich von unten mit Nährstoffen zu versorgen.

### **3. Charakterisierung und Differenzierung der angezüchteten Zellen**

Für die Interpretation der Ergebnisse sowie für die Beurteilung der Funktionalität und Effektivität der verschiedenen Kammersysteme war eine Identifizierung der kultivierten Zellen notwendig. Mit lichtmikroskopischen Untersuchungen der aus den Filtereinsätzen hergestellten histologischen Schnitte konnte der Beweis angeführt werden, dass die Zellen dreidimensional wuchsen, bzw. eine gewebespezifische Differenzierung und Architektur aufwiesen.

Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten die Identifizierung von kultivierten Keratinozyten im Perfusionskammermodell belegen. Die Keratinozyten konnten bei dieser Darstellung anhand zellspezifischer Merkmale, z.B. der Zellorganellen, identifiziert werden. Die Ausbildung dieser Merkmale war mit denen der Klauenepidermis *in vivo* vergleichbar, so konnte klar zwischen einem Stratum basale, Stratum spinosum und Stratum corneum unterschieden werden. Darüber hinaus konnte eine große Zahl intakter Mitochondrien und intakte gut entwickelte Golgifelder festgestellt werden, was auf eine hohe Vitalität und Stoffwechselaktivität in den Zellen schließen lässt. Typisch für das Erscheinungsbild von Keratinozyten, konnte die Ausbildung von Keratinfilamenten, die im Stratum basale als Filamentbündel zu den Desmosomen ziehen, beobachtet werden. Die Ausführungen von NEBEL (2005), dass sich an einigen Stellen die Keratinfilamente direkt der Kernmembran anlagern konnten mit den eigenen Untersuchungen bestätigt werden.

Im Stratum spinosum zeigten sich typische Merkmale epidermaler Zellen im Klauengewebe (MÜLLING, 1993). Die Zellen wurden zunehmend größer und die Anzahl der Keratinfilamente nahm von unten nach oben zu. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass sich mehrere Keratinfilamente im Stratum spinosum zusammenlagerten. Im Gegensatz zu den vorliegenden Verhältnissen *in vivo* wurde eine ungerichtete, willkürliche Ausrichtung der Keratinfilamente in den verschiedenen Zellen beobachtet, was der fehlenden mechanischen Belastung der Zellverbände zuzuschreiben ist (NEBEL, 2005). Im Stratum spinosum konnten zwischen den Zellen filamentfreie Räume beobachtet werden, die in der sich anschließenden Schicht (im Stratum corneum) mit Keratinfilamenten aufgefüllt wurden.

Weitere typische Merkmale für einen epidermalen Aufbau, vergleichbar mit den Bedingungen *in vivo*, wie z.B. die von NEBEL (2005) beschriebenen *membrane coated granules* (MCGs), konnten in den eigenen Gewebekulturen nicht nachgewiesen werden. Zudem konnten aus *ex vivo* Untersuchungen bekannte Phänomene, wie etwa die Auflösung der Desmosomen zwischen den Zellen des Stratum corneum, auch in den eigenen Versuchen beobachtet werden. So konnte gezeigt werden, dass die Perfusion der bovinen Zellen bzw. die Verwendung unterschiedlichen Ausgangsmaterials zu anderen Ergebnissen führte als in der Arbeit von NEBEL (2005). Organotypische Zellkulturen haben, wie bereits erwähnt, Vorteile in der Durchführung von Experimenten unter standardisierten, möglichst wenig durch äußere Faktoren beeinflussten Bedingungen. Dennoch könnte sich der *in vivo* vorhandene aber in der Zellkultur fehlende, möglicherweise wachstumsinduzierende Stimulus der Druck- und Zugbelastungen auf die Klauenepidermis, negativ auf das Wachstum und die Differenzierung der Zellen *in vitro* auswirken. Dennoch ist davon auszugehen, dass auch die in der

vorliegenden Arbeit entstandenen Scherkräfte des vorbei strömenden Mediums zu ähnlichen wachstumsinduzierenden Wirkungen bei den kultivierten Zellen geführt haben. Die Perfusion der Kammern mit dem Nährmedium erfolgte bei den eigenen Versuchen jedoch mit einem sehr geringen Druck, der folglich nicht mit den Druckbelastungen *in vivo* verglichen werden kann.

Nach ANDRIANI et al. (2004) führt die Kultivierung von Keratinozyten auf einer Schicht von Fibrozyten zur Ausbildung einer Basalmembran. Mit den eigenen Untersuchungen konnte die Ausbildung dieses organotypischen Merkmales nicht festgestellt werden. Auch in diesem Zusammenhang ist anzunehmen, dass Zellkontakte bzw. Adhäsionsmoleküle nicht exprimiert wurden. Es wurde im transmissionselektronenmikroskopischen Bild kein Hinweis auf die nach MERKER et al. (1994) für eine Basalmembran charakteristische Ausprägung von Hemidesmosomen gefunden. Nach ANDRIANI et al. (2004) ist auch der Kontakt zu den dermalen Fibrozyten entscheidend für ein organotypisches Wachstum. Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass nicht alle basalen Keratinozyten Kontakt mit den Fibrozyten hatten und dadurch die polare Organisation des Epithels teilweise verloren ging. Diese Eigenschaft trifft jedoch nur auf die basale Schicht zu, da die Keratinozyten auch hier *in vivo* keinen Kontakt zu den Fibrozyten haben. Es kann also geschlussfolgert werden, dass dieses Phänomen keinen weiteren Einfluss auf das Wachstum und die Differenzierung der Keratinozyten hatte.

Neben den mikroskopischen Untersuchungen wurden die Zellen mittels immunhistochemischer Techniken weiter charakterisiert. Basierend auf den Ausführungen von CASACO et al. (2001), PAPINI et al. (2003) und HOCHSTETTER (1998) konnte mit Antikörpern gegen AE1 und AE3 die Expression von sauren und basischen Keratinen der im Perfusionsmodell kultivierten Keratinozyten belegt werden. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper stammen aus der Humanmedizin, waren aber laut Hersteller auch gegen bovine Zytokeratine gerichtet. Zudem war aus früheren Studien der Arbeitsgruppe die Kreuzreaktivität dieser Antikörper mit bovinem Gewebe bekannt (HOCHSTETTER, 1998). Darüber hinaus bestätigten die eigenen Untersuchungen die Ausführungen von HENDRY et al. (2001), nach denen eine positive Reaktion der Zytokeratine in den angezüchteten Geweben belegt wurde.

Keratine sind die spezifischen Intermediärfilamente der Epidermiszellen (NEBEL, 2005). Daher ist die Bindung der Antikörper (AE1 und AE3) an die kultivierten Zellen ein wichtiges Kriterium für die Identifizierung von Keratinozyten. Einige Zellen, die keine Reaktion mit den Antikörpern AE1 und AE3 aufwiesen, wurden durch weitere immunhistochemische



Untersuchungen mit dem Antikörper gegen Vimentin, als Fibrozyten identifiziert. Die Differenzierung und Identifizierung der angezüchteten Zellen mittels immunhistochemischer Techniken ist jedoch generell vorsichtig zu bewerten, da grundsätzlich davon auszugehen ist, dass es sich bei den isolierten Zellen um Mischkulturen handelt, und somit auch andere Zelltypen wie z.B. Langerhanszellen etc. mit den entsprechenden Antikörpern gegen Vimentin reagieren und somit zu einem falsch-positiven Ergebnis dieser qualitativen Identifizierung führten.

Fibrozyten waren in den hergestellten Schnittserien die vorherrschende Zellart. Das Anti-Vimentin zeigte ebenfalls eine Kreuzreaktivität mit bovinen Bindegewebszellen. GRONE (2002) zeigte in seiner Arbeit, dass auch die sich schnell teilenden Keratinozyten Vimentin bilden können, die Zellen sich aber im mikroskopischen Bild morphologisch unterscheiden ließen. Die Keratinozyten stellten sich im mikroskopischen Bild als eher runde Zellen mit einem runden Zellkern dar, wohingegen die übrigen Zellen einen langgestreckten Zellkörper und einen gelappten Zellkern aufwiesen. Dieses Phänomen wurde auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet. So konnten die Zellen neben ihrer Reaktivität auf das Vimentin auch anhand ihrer Morphologie differenziert werden.

Nach BIRKNER et al. (2004) gilt das Zytokeratin 19 (CK 19) in humanen Geweben als ein Marker für undifferenzierte epidermale Stammzellen und wird daher überwiegend in der Tumordiagnostik eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit reagierte dieser Antikörper mit Anteilen des kultivierten Gewebes, was auf das Vorhandensein von wenigen Stammzellen zwischen den isolierten Keratinozyten gab. Stammzellen spielen eine wichtige Rolle, da mit ihnen ein unerschöpflicher Pool an sich immer wieder teilenden Zellen in einer Zelllinie geschaffen werden kann (PAPINI et al., 2003). Ziel der Stammzellforschung ist es, die Grundlagen der Zelldifferenzierung und die Möglichkeiten ihrer Beeinflussung zu entschlüsseln und mit solchen biomedizinischen Forschungen neue Therapieansätze für derzeit nicht oder nur schwer heilbare Krankheiten, wie z.B. die Klauenrehe zu entwickeln. So wird in der Humanmedizin bereits *in vitro* versucht, durch Anzüchtung von Stammzellen bzw. *transit amplifying cells* Zellpopulationen zu schaffen, die später in erkrankte Gewebe injiziert werden können. *Transit amplifying cells* werden aufgrund ihres gegenüber den Stammzellen schnelleren Wachstums bevorzugt, da Stammzellen sich eher langsam vermehren (BICKENBACH et al., 1998). Es ist also vorstellbar, dass mit der Technologie des in dieser Arbeit präsentierten Perfusionsmodells auch Stammzellen bzw. *transit amplifying cells* aus Rinderembryonen, Knochenmarkspunktionen oder aus bovinem Gewebe angezüchtet werden können.

In der Humanmedizin geht man davon aus, dass injizierte Stammzellen sich in betreffenden Geweben weiter teilen und zu den Funktionszellen des Gewebes differenzieren (DUNNWALD et al., 2001). So gibt es z.B. Hinweise, dass sich Stammzellen aus dem Knochenmark im Gehirn zu Nervenzellen entwickeln, die den übrigen Neuronen des zentralen Nervensystems ähneln (DUNNWALD et al., 2001). So verfolgt die Wissenschaft weiterhin das Ziel im Rahmen des „*tissue engineering*“ aus Stammzellen komplexe Zellverbände bzw. Gewebe für die Transplantation zu züchten. Fortschritte auf diesem Gebiet würden das Risiko von Unverträglichkeits- und Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen deutlich reduzieren.

Der verwendete Anti-Pan Cadherin Antikörper bindet an alle aus der Cadherin Familie stammenden Rezeptoren. Nach HINES et al. (1999) werden diese in allen Hautschichten von Keratinozyten exprimiert. TAKEDA (2004) beschreibt, dass in Abwesenheit von Cadherin kein mehrschichtiges Epithel entstehen kann. Eine Aussage, die mit den eigenen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit, auch für das Epithelgewebe der Rinderklaue, bestätigt werden konnte. Der Anti-Pan Cadherin Antikörper zeigte eine deutlich spezifische Reaktion in den Gewebeschnitten des Stratum superficiale der kultivierten Zellen.

Desmosomen sind, wie unter Punkt 2.2 bereits erwähnt, charakterisiert durch transmembrane Cadherine. Mit dem Nachweis von Cadherinen ist davon auszugehen, dass Desmosomen in den angezüchteten Geweben vorhanden waren. Die Zellen standen also miteinander in Kontakt, d.h. die Differenzierung der Zellen war weit fortgeschritten. Es ist zudem davon auszugehen, dass durch die Anwesenheit von Desmosomen wichtige Regulationsmechanismen, wie z.B. die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren in den angezüchteten Geweben vorhanden waren. Die Desmosomendichte kann man eher als gering bezeichnen, wobei es anhand der TEM Aufnahmen aber zu keinem ultrastrukturellen Unterschied zu der Situation *in vivo* kam. Als Ursache hierfür kommt die fehlende Belastung auf das Gewebekonstrukt in Frage.

#### **4. Beispiele für die Anwendbarkeit des Modells**

Um die Funktionalität des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten *in vitro* Systems zu untersuchen, wurden vier Faktoren (KGF, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-1) ausgewählt, die nach HENDRY et al. (2001) für die Pathogenese der Klauenrehe *in vivo* relevant sind und in der Humanmedizin einen nachgewiesenen Einfluss auf die Proliferation von Keratinozyten haben. Im Gegensatz zu humanen Keratinozyten waren bovine Keratinozyten in den vergangenen Jahren nur in den Arbeiten von HENDRY et al. (2001) und NEBEL (2005) Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Daher werden die eigenen Ergebnisse für die

verschiedenen Faktoren im Folgenden vor dem Hintergrund humanmedizinischer Studien diskutiert.

#### **4.1 Auswirkungen auf die Zellproliferation durch KGF**

Zunächst wurde der Einfluss des *Keratinocyte growth factor* (KGF) auf die kultivierten Zellen untersucht. Nach WERNER und SMOLA (2001) gilt KGF als Hauptmediator der epithelial-mesenchymalen Interaktionen. Laut MINUTH et al. (2004) hat KGF als Medienzusatz keinen Einfluss auf das Wachstum von humanen Keratinozyten *in vitro*. Nach ANDREADIS et al. (2001) induziert KGF dramatische dreidimensionale Veränderungen bei *in vitro* Kulturen. So kommt es nach ANDREADIS et al. (2001) nach Zugabe von KGF zu einer Hyperproliferation der Keratinozyten und dadurch bedingt zu einem Anstieg an Stoffwechselprodukten bzw. zu einer Unterversorgung der Zellen, wodurch eine Vielzahl von Zellen abstarb. Allerdings stützen sich diese Aussagen auf Versuchen an humanen Keratinozyten in statischen Kulturen. Die Untersuchungen im Rahmen dieses Dissertationsprojektes sollten überprüfen, welche dieser Aussagen auf die Proliferation von bovinen Keratinozyten zutreffen. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellzahl bei den Zellkulturen, die mit KGF als Zusatz zum Nährmedium stimuliert wurden, einen schnelleren Anstieg aufwies als der Kontrollversuch ohne den Zusatz von KGF. Am fünften Tag der Perfusion wurde die höchste mittlere Zellzahl in beiden durchgeführten Versuchsreihen registriert, während am sechsten Tag der Kultivierung die Zellzahl wieder abfiel. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen HENDRY et al. (2001). Die Autoren schlussfolgerten, dass die Zellen ihre Proliferations- und Wachstumsphase nahezu abgeschlossen haben und sich anschließend zu ausgereiften Keratinozyten differenzieren. Die Abnahme der Zellzahl ist vermutlich durch Ablösung ausdifferenzierter Keratinozyten vom Untergrund bzw. dem Filtereinsatz zu erklären, wobei ein Teil der gezüchteten Zellen mit dem Perfusionsstrom des Nährmediums abgeschwommen sein könnte. Darüber hinaus kommen der programmierte Zelltod, das Absterben der Zellen durch Unterversorgung, das Absterben durch Vergiftung mit angefallenen Stoffwechselprodukten differenzierter Keratinozyten sowie deren Ablösung aus dem Zellverband als Erklärung für die Abnahme der Zellzahl in Frage.

#### **4.2 Auswirkungen auf die Zellproliferation durch GM-CSF**

Der *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) spielt laut MASS-SZABOWSKI et al. (2001) eine wichtige Rolle in der Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten. Er gehört zu der Familie der Zytokine (UCHI et al., 2000). Nach BORAS et al.

(2004) besitzt dieser Faktor eine mitogene Wirkung und fördert zudem die terminale Differenzierung suprabasaler Zellen der Epidermis (WERNER und SMOLA, 2001). Der GM-CSF spielt eine wichtige Rolle im Krankheitsgeschehen der Schuppenflechte (Psoriasis) beim Menschen. Durch GM-CSF werden Keratinozyten angeregt die Ausschüttung von weiteren Zytokinen zu induzieren, was im Falle der Psoriasis zu einer pathologischen Hyperkeratinisierung der Haut führt (MOSSNER et al., 2004). Es ist also vorstellbar dass dieser Faktor den gleichen Effekt auf bovine Zellverbände hat und durch die Ausschüttung von Zytokinen zum Krankheitsbild der Klauenrehe führen kann.

Die eigenen Ergebnisse bestätigen die oben erwähnten Ausführungen von MAAS-SZABOWSKI et al. (2001) und BORAS et al. (2004) auch für bovine Keratinozyten. Unter dem Einfluss von GM-CSF war bei den eigenen Versuchen ein Anstieg der Zellzahl in den ersten drei bis vier Tagen zu verzeichnen. Nach den ersten vier Tagen nähert sich die Zahl der Zellen aus der Versuchskultur der Zellzahl der Kontrollkultur also der ohne GM-CSF behandelten Zellen an. Es kann davon ausgegangen werden, dass auch *in vivo* eine erhöhte Ausschüttung dieses Faktors durch Stress oder Infektionen zu einer Hyperkeratinisierung an der Rinderklaue führen kann und dadurch einen Weg für weitere entzündliche Prozesse und damit für weitere Reheepisoden öffnet. Auch bei der Zugabe dieses Faktors konnte nach dem sechsten Perfusionstag eine Abnahme der Zellzahl beobachtet werden. Die erzielten Ergebnisse unter dem Einfluss von GM-CSF werden ähnlich wie die Merkmale der unter dem Einfluss von KGF stehenden Zellen interpretiert. Auch im Falle des GM-CSF kann von einer Abnahme der Zellzahl aufgrund des programmierten Zelltodes differenzierter Zellen ausgegangen werden. Zudem kann die Mehrschichtigkeit des „Zellrasens“ zu Defiziten im Adhäsionsvermögen zwischen den Zellschichten geführt haben und somit Zellverluste verursacht haben.

### **4.3 Auswirkungen auf die Zellproliferation durch TNF- $\alpha$**

Der *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ) ist ein multifunktionelles Zytokin, das eine Rolle bei Entzündungen, Immunantwort und dem programmierten Zelltod spielt (LOCKSLEY et al., 2001). Es gehört zu den am meisten untersuchten Zytokinen. Seine Rolle bei Krankheitsgeschehen wird in der Literatur von verschiedenen Autoren kontrovers diskutiert. TNF- $\alpha$  wird von Makrophagen, Monozyten und epithelialen Keratinozyten gebildet (CHEN und GOEDDEL, 2002). BANNO et al. (2004) beschrieben, dass TNF- $\alpha$  zudem eine wichtige Rolle bei Wundheilung, Zellbewegung und Zellvermehrung spielt. In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss dieses Faktors auf bovine Keratinozyten untersucht werden. Es sollte

herausgefunden werden, ob TNF- $\alpha$  auch bei einem *in vitro* Modell boviner Zellen in der Lage ist, die Proliferationsrate dieser Zellen und damit letztendlich die Zellzahl zu erhöhen.

MAKELA et al. (1998) zeigten, dass unter dem Einfluss von TNF- $\alpha$  stehende Keratinozyten vermehrt Matrixmetalloproteinasen (MMP) ausschütten. Nach MÜLLING und LISCHER (2002) sowie HENDRY et al. (2003) spielen gerade die MMPs eine wichtige Rolle im Krankheitsbild der Klauenrehe, so dass diesem Regelmechanismus eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Klauenrehe zukommen dürfte.

GEORGE und GEORGE (2001) stellten durch ihre Versuche an einem Hautäquivalent fest, dass TNF- $\alpha$  keinen Einfluss auf die Proliferation von Keratinozyten hat. Diese These konnte mit den eigenen Untersuchungen bestätigt werden. So zeigte sich, dass es in der mit TNF- $\alpha$  perfundierten Versuchskultur keine Steigerung der Proliferationsrate der Keratinozyten gegenüber denen aus der Kontrollkultur gab. Im Gegensatz dazu konnte sogar eine Minderung der Proliferationsrate unter dem Einfluss dieses Zytokines festgestellt werden.

#### **4.4 Auswirkungen auf die Zellproliferation durch Interleukin-1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ )**

Ob die Klauenrehe in ihrer Initialphase ein entzündlicher Prozess ist, konnte auch in neusten Studien nicht vollständig geklärt werden. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit die Wirkung des proinflammatorischen Zytokins IL-1  $\alpha$  auf die Zellen geprüft werden. IL-1  $\alpha$  wird lokal von bovinen Keratinozyten gebildet und innerhalb der Zelle gespeichert. Durch chemische und physikalische Noxen kann es freigesetzt werden (MAAS-SZABOWSKI et al., 1999).

MAAS-SZABOWSKI et al. (1999) wiesen nach, dass Interleukin 1  $\alpha$  (IL-1  $\alpha$ ) keinen direkten Einfluss auf das Wachstum von Keratinozyten hat, aber Fibrozyten anregt KGF zu exprimieren, der wiederum auf das epidermale Wachstum einwirkt. Isolierte bovine Fibrozyten wurden in den eigenen Versuchen mit IL-1  $\alpha$  inkubiert und das gewonnene Medium danach abgenommen und steril filtriert. Schließlich wurde es, wie in den anderen Versuchen, für sechs Tage an Keratinozyten getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass das konditionierte Medium einen sehr geringen, bzw. keinen Einfluss auf die Proliferationsrate hatte. Daraus lässt sich schliessen, dass entweder die Synthese von KGF durch die Fibrozyten sistierte, oder dass Bestandteile des Mediums bereits nach der Einwirkzeit von zwei Tagen verbraucht waren, und somit zu einem geringem Wachstum führten.

## **5. Anwendungsmöglichkeiten der untersuchten Perfusionssysteme in der Veterinärmedizin**

Die Etablierung des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Perfusionsmodells stellt eine wichtige Grundlage für die Weiterentwicklung und vor allem für die experimentelle Anwendung dieser Modelle dar. Gegenüber der statischen Zellkultur bietet ein Perfusionsmodell entscheidende Vorteile. Die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit belegen, dass eine Zellkultur aus bovinen Keratinozyten im Perfusionssystem sich den Verhältnissen *in vivo* annähert, also eine organotypische Kultur bildet, die in der Lage ist, ungleich aufwendigere und ethisch bedenkliche Tierversuche zu reduzieren oder gar zu ersetzen. Darüber hinaus sind die Versuchsbedingungen für die verschiedensten Studien mit Hilfe eines Perfusionsmodells leichter zu standardisieren. Es kann über das kontinuierlich perfundierte Nährmedium nicht nur eine optimale Versorgung der Zellen resp. des Gewebes gewährleistet werden, sondern es können auch verschiedene Mediatoren, Faktoren oder Arzneimittel in definierten Konzentrationen konstant zugesetzt werden, um deren Wirkung an den entsprechenden Zellen zu untersuchen und zu dokumentieren. Der kontinuierliche Abtransport zelltoxischer Stoffwechselprodukte erhöht die Überlebenszeit der gezüchteten Zellkulturen im erheblichen Maße. Dies wurde durch die eigenen Befunde klar bestätigt. Nach NEUß-STEIN (2004) ist bei kultiviertem artifiziellem Gewebe ab einer Dicke von 1 mm eine Versorgung der Zellen nicht mehr allein durch Diffusion von Nährstoffen zu bewerkstelligen. Mittels eines Perfusionsmodells kann jedoch auch eine Versorgung von Zellrasen mit mehr als 1mm Dicke erzielt werden.

Neben der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Anwendungsmöglichkeit zur Erforschung dermoepidermaler Interaktionen in der Rinderklaue stellt das Perfusionsmodell ein viel versprechendes Instrument für unsere Arbeitsgruppe bei der weiteren Untersuchung des Krankheitskomplexes der Klauenrehe dar. Es kann auch geschlussfolgert werden, dass aufgrund der einfachen und leicht zu kontrollierenden Anwendung dieses Modells ein vielseitiger Einsatz im Bereich der Zellforschung, auch über die Grenzen der Veterinärmedizin hinaus, möglich ist. Das in der vorliegenden Arbeit etablierte Perfusionsmodell könnte auch Gegenstand wichtiger Untersuchungen zur Pathogenese der Rehe des Pferdehufes, Studien zur Angiogenese verschiedener Gewebe, bzw anderer bedeutender Forschungen auf zellulärer Ebene und dem Einfluss verschiedener Mediatoren auf diese Gewebe, sein.

Bei der Klauenrehe handelt es sich um ein multifaktorielles Krankheitsgeschehen, das besonders in der intensiven Haltung von Hochleistungsmilchrindern eine große wirtschaftliche Rolle spielt. Untersuchungen, die zu einem besseren Verstehen der Vorgänge auf zellulärer Ebene im Bereich der Rinderklaue führen und so möglicherweise zu einer Prävention und/oder Therapie dieser schwerwiegenden Krankheit beitragen, haben somit eine große Bedeutung. Einsatz zu anderen Fragestellungen: Pathomechanismen von Hauterkrankungen, lokale parakrine und autokrine Regulationsmechanismen können weiter aufgeklärt werden. Untersuchungen mit unterschiedlichen Faktoren oder pharmakologischen Substanzen wie z.B. Entzündungshemmern, Biotin, Zytokinen, MMPs oder Wachstumsfaktoren an Keratinozyten und Fibrozyten könnten weitere Erkenntnisse zum Krankheitsgeschehen der Klauenrehe liefern. Auch die Verwendung unterschiedlicher Kombinationen von Zelllinien oder die möglicherweise durch Druckerhöhung des perfundierten Mediums provozierte Klauenrehe sollten Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Der relativ große Aufwand für die technologische Entwicklung und Optimierung der vorgestellten Perfusionskammermodelle ist in Anbetracht des Potentials dieser Modelle für die Erforschung der Interaktionen in der Pathogenese der Klauenrehe und weiterer Funktionsstörungen gerechtfertigt. Diese technologische Arbeit leistet einen weiteren Beitrag für die Weiterentwicklung von Tierversuchersatzmethoden. Perspektivisch ist mit der vorgelegten technischen Arbeit die Basis für die Weiterentwicklung und speziesübergreifende Anwendung geschaffen worden.