

F: Zusammenfassung

Perfusionskammersysteme zur Entwicklung organotypischer Kokulturen boviner Fibrozyten und Keratinozyten aus der Rinderklaue

Ein organotypisches dermoepidermales *in vitro* Modell aus bovinen Fibrozyten und Keratinozyten der Rinderklaue wurde basierend auf den Untersuchungen von NEBEL (2005) entwickelt, charakterisiert und experimentell eingesetzt. Enzymatische Zellisolierungsverfahren wurden an die besonderen Eigenschaften des Klauengewebes adaptiert, um die Kultivierung zu optimieren. Mit diesen Verfahren konnten Dermis und Epidermis zuverlässig und exakt voneinander getrennt werden, um im weiteren Verlauf möglichst reine Kulturen beider Zelltypen zu erhalten. Die isolierten Primärkulturen und daraus kultivierten Zelllinien wurden mittels morphologischer und immunhistochemischer Untersuchungstechniken charakterisiert.

Kommerziell erhältliche Perfusionskammersysteme wurden derart modifiziert, dass die isolierten Zellen in den Kammern angezüchtet werden konnten. Da die kommerziellen Kammern technisch suboptimal waren, wurden eigene neue Kammersysteme entwickelt und für die Langzeitperfusionskultur verwendet. Anders als in statischen Kulturen wurde aufgezeigt, dass in einer Perfusionskammer die beiden Zelltypen schneller proliferierten, sich organspezifisch differenzierten und über Monate vital blieben. Es wurden Filtermaterialien gefunden, die als Biomembranen geeignet sind, um die Grundlage für das Wachstum der organotypischen Kulturen zu bilden.

Mit den technisch optimierten Perfusionskammersystemen konnten Fibrozyten und Keratinozyten aus dem Klauengewebe erfolgreich dreidimensional angezüchtet werden. Die licht- und elektronenmikroskopischen sowie die immunhistochemischen Untersuchungen belegen, dass die räumliche Anordnung, also die Gewebearchitektur und die Differenzierung der Zellen der Situation *in vivo* weitgehend entsprachen; es konnten also organotypische Verhältnisse *in vitro* erreicht werden. Diese organotypischen Kulturen wurden experimentell eingesetzt, um ausgewählte Wachstumsfaktoren und Zytokine, die in der Pathogenese der Klauenrehe eine Rolle spielen sollen, zu untersuchen. Es wurden die Effekte von vier Faktoren (*Keratinocyte growth factor*, *granulocyte macrophage-colony stimulating factor*, *interleukin 1-alpha* und *tumor necrosis factor-alpha*) auf die Proliferation und Differenzierung der Horn bildenden Keratinozyten *in vitro* untersucht. Die Ergebnisse belegen, dass die Proliferation der Horn bildenden Zellen der Klaue durch diese Zytokine

moduliert wird. Diese Faktoren sind damit sehr interessante Kandidaten für weiterführende Untersuchungen zur Pathophysiologie der Klauenrehe.

Die in dieser Arbeit entwickelten und erprobten organotypischen Kulturen und Perfusionskammersysteme sind leistungsfähige Werkzeuge für weiterführende Arbeiten zur dermoepidermalen Interaktion in der Pathogenese der Klauenrehe und zum Studium beteiligter Pathomechanismen. Die Systeme und die Technologie bilden darüber hinaus eine Grundlage für die Bearbeitung entsprechender Fragestellungen bei andern Tierarten, also z.B. bei der Erforschung der an der Pathogenese der Hufrehe beteiligten Gewebeinteraktionen. Darüber hinaus sind diese Systeme eine Grundlage für die Untersuchung von Regulations- und Pathomechanismen in anderen Geweben/Organsystemen, wie z.B. der Haut oder der Placenta, in denen die dermoepidermale Kommunikation eine Rolle für den Erhalt der Gewebeintegrität und der Entwicklung von Erkrankungen spielt.