

Aus der Klinik für Augenheilkunde  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Gerd Geerling

**Einfluss verschiedener Lagerungsbedingungen auf  
dezellularisierte porcine Konjunktiva als Ersatzgewebe zur  
Bindehautrekonstruktion**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von

Adam Alexander Skornia

2023

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. Kristina Spaniol

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Dr. rer. pol. Svenja Caspers

*Widmung*

*meinen Eltern*

Teile dieser Arbeit wurden vorab veröffentlicht:

**Skornia A, Geerling G, Spaniol K, Witt J. Influence of Storage Conditions on Decellularized Porcine Conjunctiva. Bioengineering (Basel). 2023 Mar 11;10(3):350.**

Das Urheberrecht verbleibt bei den Autoren.

## Zusammenfassung

Porzine (vom Schwein stammende) dezellularisierte Konjunktiva (PDK) gilt als ein alternatives Ersatzgewebe für die Bindehautrekonstruktion. Es existieren bereits Methoden der Reepithelialisierung von PDK mit primären humanen konjunktivalen Epithelzellen (HCEC = *Human Conjunctival Epithelial Cells*) vor Transplantation ins Tiermodell. Eine Möglichkeit zur Lagerung kann die weitere Erforschung und die klinische Verwendung dezellularisierter Gewebe vereinfachen. Eine längerfristige Lagerung von PDK wurde bisher nicht untersucht. Diese Studie beschreibt der Einfluss mehrerer Lagerungsvarianten auf die Extrazellulärmatrix (EZM) von PDK.

PDK wurden in sechs Gruppen eingeteilt und (1) in phosphatgepuffertes Salzlösung (PBS) bei 4 °C, (2) in glycerolhaltigem Kryomedium bei -80 °C sowie (3) in Dimethylsulfoxid (DMSO)-haltigem Kryomedium in Flüssigstickstoff für jeweils zwei und sechs Monate gelagert. Als Kontrolle dienten für maximal 96 h in PBS (4 °C) gelagerte PDK. Anschließend wurden die EZM-Architektur mittels Licht- (n = 4) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM, n = 3), der Gehalt an EZM-Proteinen (Kollagen: n = 10; Elastin: n = 6), biomechanische Parameter (n = 9) sowie für PDK nach sechsmonatiger Lagerung die Möglichkeit der Rezellularisierung *in vitro* mit primären HCEC verglichen.

PDK aller Lagerungsgruppen wiesen eine erhaltene EZM-Dichte ohne Strukturunterbrechungen und Gewebeauflockerungen auf ( $p \geq .74$ ). Ultrastrukturell zeigten sich in allen Gruppen vergleichbare Faserverläufe, -dicken und -begrenzungen. Die Proteinquantifizierung wies keine signifikanten Unterschiede des Kollagen- und Elastingehaltes auf (Kollagen:  $p \geq .18$ ; Elastin:  $p \geq .13$ ). Biomechanisch ergaben sich in Bezug auf die Elastizitäts- und Dehnungseigenschaften keine signifikanten Unterschiede ( $p \geq .06$ ). Nur PDK der DMSO-Gruppe nach sechsmonatiger Lagerung zeigten im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant reduzierte Zugfestigkeit ( $0.46 \pm 0.21$  MPa vs.  $0.87 \pm 0.25$  MPa;  $p = .02$ ). Die Reepithelialisierung aller gelagerten PDK war möglich, vergleichbar zwischen den Gruppen ( $p \geq .35$ ) und ergab ein durchschnittlich ein- bis zweischichtiges Epithel.

Alle untersuchten Lagerungsmethoden konservierten wesentliche Gewebeeigenschaften der PDK und eignen sich mindestens für ihre halbjährige Lagerung. Die Reepithelialisierung aller PDK schließt zytotoxische Einflüsse der Lagerungsvarianten aus, sodass eine erhaltene Biokompatibilität der gelagerten PDK *in vivo* zu erwarten ist.

## Summary

Porcine (derived from pigs) decellularized conjunctiva (PDC) is handled as an alternative tissue for conjunctival reconstruction. In addition, methods of re-epithelialization of PDC *in vitro* with primary human conjunctival epithelial cells (HCEC = Human Conjunctival Epithelial Cells) prior to transplantation in animal models have already been developed. The storage of decellularized tissue can simplify further research and its clinical use. As there are no studies on storage of PDC yet, the current study investigated the influence of several storage variants on the extracellular matrix (ECM) of PDC.

PDC were divided into six groups and stored (1) in phosphate-buffered saline (PBS) at 4 °C, (2) in glycerol-containing medium at -80 °C and (3) in dimethylsulfoxide (DMSO)-containing medium in liquid nitrogen for two and six months. PDC stored in PBS (4 °C) for a maximum of 96 h served as control. Subsequently, histological (light microscopy, n = 4) and ultrastructural (transmission electron microscopy = TEM, n = 3) analysis of ECM-architecture, content of ECM proteins (collagen: n = 10; elastin: n = 6), biomechanical parameters such as elasticity, tensile strength and stretching properties (n = 9) as well as the possibility of recellularization *in vitro* with primary HCEC for PDC were compared between groups.

After all forms of storage PDC showed a preserved ECM-density without structural interruptions or tissue loosening ( $p \geq .74$ ). Ultrastructural analysis showed comparable fiber structure, -thickness and -organization in PDC of all groups. Protein quantification showed no significant differences in collagen and elastin content (collagen:  $p \geq .18$ ; elastin:  $p \geq .13$ ). The evaluation of the biomechanics with regard to elasticity and stretching properties of the PDC did not reveal any significant deviations ( $p \geq .06$ ). PDC after cryo-preservation in DMSO-containing medium for six months showed a significantly reduced tensile strength compared to the control ( $0.46 \pm 0.21$  MPa vs.  $0.87 \pm 0.25$  MPa;  $p = .02$ ). Reepithelialization of all PDC was possible, comparable between groups ( $p \geq .35$ ) and resulted in an epithelium with an average of one to two layers.

All investigated storage methods preserved essential tissue properties of PDC and are suitable for a storage period of at least six months. The possible reepithelialization of all PDC excludes cytotoxic influences of the storage variants so that preserved biocompatibility of the stored PDC *in vivo* can be expected.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AMT</b>	Amnionmembrantransplantation
<b>CALT</b>	<i>Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue</i>
<b>CEC</b>	<i>Conjunctival Epithelial Cells</i>
<b>Co</b>	Cobalt
<b>CPC</b>	<i>Conjunctival Progenitor Cells</i>
<b>CSC</b>	<i>Conjunctival Stem Cells</i>
<b>DK</b>	Dezellularisierte Konjunktiva
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>ECM</b>	<i>Extracellular Matrix</i>
<b>EM</b>	Epithelzellmedium
<b>E-Modul</b>	Elastizitätsmodul
<b>EZM</b>	Extrazellulärmatrix
<b>FBS</b>	Fetales bovines Serum
<b>GMP</b>	<i>Good Manufacturing Practice</i>
<b>Gy</b>	Gray
<b>HAM</b>	humane Amnionmembran
<b>HCEC</b>	<i>Human Conjunctival Epithelial Cells</i>
<b>HDK</b>	humane dezellularisierte Konjunktiva
<b>hEGF</b>	<i>Human Epidermal Growth Factor</i>
<b>HK</b>	humane Konjunktiva
<b>MMC</b>	Mitomycin C

<b>NaDC</b>	Natriumdesoxycholsäure
<b>Pa</b>	Pascal (N / m <sup>2</sup> )
<b>P/S</b>	Penicillin / Streptomycin
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PCC</b>	<i>Plastic Compressed Collagen</i>
<b>PCL</b>	Poly-ε-Caprolacton
<b>PDC</b>	<i>Porcine Decellularized Conjunctiva</i>
<b>PK</b>	porzine dezellularisierte Konjunktiva
<b>PERV</b>	porzines endogenes Retrovirus
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PK</b>	porzine Konjunktiva
<b>PLGA</b>	Poly(lactid-co-glycolid)
<b>PTFE</b>	Polytetrafluorethylen
<b>rpm</b>	<i>revolutions per minute</i>
<b>TEM</b>	Transmissionselektronenmikroskopie
<b>ü. N.</b>	über Nacht

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Anatomie und Physiologie der Konjunktiva.....	1
1.2 Bindehautrekonstruktion.....	4
1.2.1 Indikationen für eine Bindehautrekonstruktion.....	4
1.2.2 Anforderungen an ein Bindehautersatzgewebe.....	4
1.3 Klinisch verwendete Ersatzgewebe und ihre Limitationen.....	5
1.4 Erforschung weiterer Ersatzgewebe zur Bindehautrekonstruktion.....	7
1.4.1 Synthetische Ersatzgewebe.....	7
1.4.2 Ersatzgewebe auf der Basis natürlich vorkommender Proteine.....	8
1.5 Dezellularisierte Gewebe.....	9
1.5.1 Hintergrund und funktionelle Bedeutung der Extrazellulärmatrix (EZM).....	9
1.5.2 Dezellularisierungsverfahren.....	11
1.5.3 Beispiele für die klinische Anwendung dezellularisierter Konstrukte.....	12
1.5.4 Herausforderungen bei der Entwicklung und Anwendung dezellularisierter Gewebe.....	13
1.6 Dezellularisierte Konjunktiva.....	15
1.6.1 Etablierung eines Dezellularisierungsverfahrens für Konjunktiva.....	15
1.6.2 Vorarbeiten zur Reepithelialisierung dezellularisierter Konjunktiva.....	17
1.7 Lagerung dezellularisierter Gewebe.....	18
1.8 Ziele der Arbeit.....	20
2. Material und Methodik.....	22
2.1 Gewinnung von porziner dezellularisierter Konjunktiva (PDK).....	22
2.1.1 Präparation und Dezellularisierung porziner Konjunktiva.....	22
2.1.2 Lagerung von PDK.....	23
2.2 Histologie.....	25
2.3 Transmissionselektronenmikroskopie.....	26

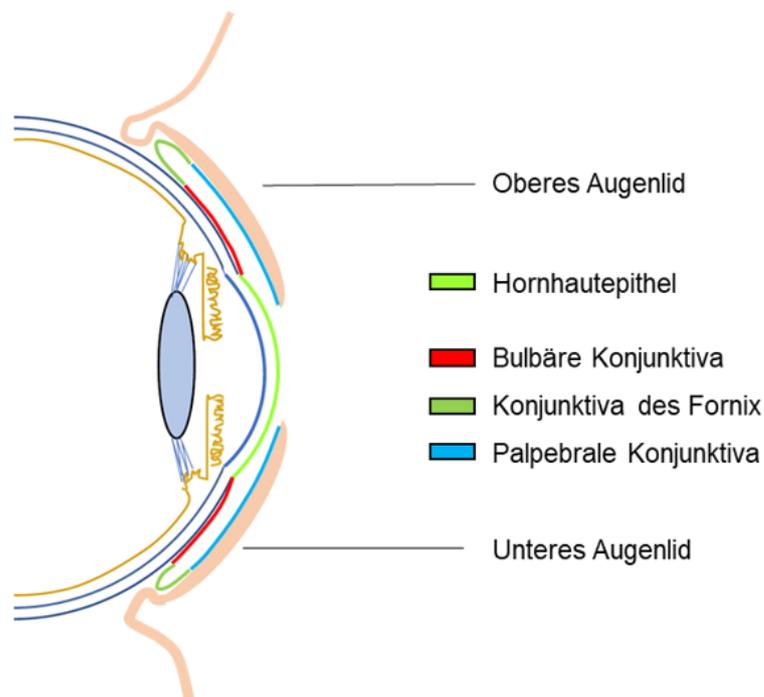
2.4 Quantifizierung von Proteinen der EZM.....	27
2.4.1 Bestimmung des Kollagengehalts .....	27
2.4.2 Bestimmung des Elastingehalts.....	28
2.5 Evaluation der Biomechanik .....	28
2.6 Reepithelialisierung der PDK .....	29
2.6.1 Gewinnung von HCEC für die Rezellularisierung.....	29
2.6.2 Rezellularisierung der PDK mit HCEC.....	31
2.6.3 Histologische Auswertung rezellularisierter PDK .....	33
2.7 Statistik.....	34
2.8 Ethikvotum.....	34
3. Ergebnisse.....	35
3.1 Strukturergalt der Extrazellulärmatrix .....	35
3.2 Erhalt der EZM-Proteine.....	38
3.3 Biomechanik .....	38
3.4 Reepithelialisierung der PDK .....	40
4. Diskussion.....	42
4.1 Strukturergalt.....	42
4.2 Biomechanik .....	45
4.3 Reepithelialisierungsfähigkeit.....	49
4.4 Schlussfolgerung und Ausblick.....	52
5. Literaturverzeichnis .....	55
6. Anhang.....	64
Nr. 1: Histologie – Entwässerungsprotokoll .....	64
Nr. 2: Protokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	64
Nr. 3: TEM – Fixierungs- und Einbettungsprotokoll.....	65
Nr. 4: Übersichtsaufnahme rezellularisierter PDK .....	66

# 1. Einleitung

## 1.1 Anatomie und Physiologie der Konjunktiva

Die anteriore Grenze des Auges wird durch die Kornea (Hornhaut) und Konjunktiva (Bindehaut) gebildet. Letztere schließt sich zirkulär an die zentral liegende Kornea an und wird in einen bulbären, den Augapfel bedeckenden Teil, einen palpebralen Teil, der die Innenseite des oberen und unteren Augenlides auskleidet, und den Fornixbereich unterteilt. Dieser stellt den anatomischen Übergang von bulbärer zu palpebraler Konjunktiva dar (Abb. 1). Die Gesamtheit der drei genannten konjunktivalen Anteile wird als Bindehautsack bezeichnet. Die Konjunktiva geht an den Rändern der Lider in die Lidhaut über.

Während der an den Limbus, d.h. den Übergangsbereich zwischen Kornea und Konjunktiva, angrenzende Teil der Konjunktiva der Sklera (Lederhaut) fest anhaftet, sitzt die bulbäre Konjunktiva dieser nur locker auf und bildet damit zusammen mit einem intakten Tränenfilm die funktionelle Grundlage für eine flexible Augenbeweglichkeit in alle Richtungen [1, 2].



**Abb. 1: Darstellung der konjunktivalen Abschnitte an einem vereinfachten Schema des vorderen Augenabschnitts.**



**Abb. 2: Native humane Konjunktiva (bulbär) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung in 100 × Vergrößerung.** Erkennbar ist ein mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel mit darunterliegendem lockeren Bindegewebe (\*). Bei den mit Pfeilspitzen markierten Strukturen handelt es sich um Becherzellen.

Als Bestandteil der Körperoberfläche ist die Konjunktiva als Schleimhaut von einem unverhornten Oberflächenepithel bedeckt, das je nach Lokalisation eine unterschiedliche Morphologie aufweisen kann. Während der Fornixbereich beispielsweise von einem mehrschichtigen hochprismatischen Epithel ausgekleidet wird, lässt sich in anderen konjunktivalen Anteilen ein mehrschichtiges Plattenepithel oder mehrschichtiges kubisches Epithel finden. Auch die Schichtdicke ist uneinheitlich und kann je nach physiologischem oder histologisch-artifiziellem Dehnungszustand unterschiedlich ausfallen. Für bulbäre Konjunktiva sind sechs bis neun Schichten beschrieben (Abb. 2), für die palpebrale und fornikale Konjunktiva circa zwei bis drei [3]. Über die gesamte Konjunktiva verteilt, jedoch mit einer Häufung im Fornix und den nasalen Abschnitten, finden sich große, sekretorische Zellen, die sogenannten Becherzellen, die sich durch das Vorhandensein von muzinhaltigen (= schleimhaltigen) Granula kennzeichnen. Diese können vereinzelt oder gruppiert vorkommen [4]. Unterhalb des Epithels erstreckt sich die zugehörige Basalmembran, die dem konjunktivalen Stroma (Substantia propria) aufliegt.

Physiologisch kommt der Konjunktiva unter anderem eine Schutz- und Barrierefunktion der Augenoberfläche zu. Neben dem Epithel tragen auch eine reichliche Vaskularisierung des konjunktivalen Stromas sowie das Vorhandensein von lymphatischem Gewebe

(CALT = *Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue*) zur konjunktivalen Schutzfunktion bei. Letzteres setzt sich aus verschiedenartigen Immunzellen wie Monozyten, Langerhanszellen, Mastzellen und Lymphozyten zusammen und ist durch eine unspezifische und spezifische Immunantwort maßgebend für die Infektabwehr [5].

Eine weitere wichtige Bedeutung hat die Konjunktiva für den Feuchtigkeitserhalt auf der Augenoberfläche. Es ist bekannt, dass Benetzungstörungen der Augenoberfläche pathophysiologisch eine Inflammation, konjunktivale Epitheldefekte sowie eine Epithelmetaplasie hervorrufen können [6]. Zudem leistet die Befeuchtung der Augenoberfläche einen Beitrag zur Refraktion, d.h. der Brechkraft des Auges. Der Tränenfilm ist dabei das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels mehrerer Strukturen der Tränenfunktionseinheit, v.a. der Tränendrüse, der Meibom-Drüsen der Lider, der Becherzellen sowie der konjunktivalen und kornealen Epithelzellen. Es ist bekannt, dass sich neben den Becherzellen auch bei den konjunktivalen Epithelzellen eine Muzinproduktion (MUC1, MUC4, MUC16) nachweisen lässt. Die Muzine der Epithelzellen finden sich membranassoziiert innerhalb der apikalen Schicht des Epithels und formen auf diese Weise die Glykokalyx, die einen Übergangsbereich zwischen dem Epithel und dem Tränenfilm bildet [7].

Das konjunktivale Epithel zeichnet sich, wie auch andere Oberflächenepithelien des menschlichen Körpers, durch eine Regenerationskapazität aus, die auf dem Vorhandensein von konjunktivalen Stammzellen (CSC = *Conjunctival Stem Cells*) und den aus ihnen hervorgehenden konjunktivalen Progenitorzellen (CPC = *Conjunctival Progenitor Cells*) basiert. Die Unterscheidung zwischen CSC und CPS beruht auf dem Fehlen spezifischer Marker für CSC. Auf der Suche nach der genauen Lokalisation und Verteilung der CPC innerhalb der Konjunktiva sind viele experimentelle Ansätze verfolgt und zum Teil widersprüchliche Aussagen getroffen worden [8-11]. Aktuell geht man davon aus, dass Zellen mit einer hohen Teilungsrate über die gesamte Augenoberfläche verteilt sind und es gibt Hinweise dafür, dass sich eine höhere Dichte der Stammzellen in der nasalen Konjunktiva sowie im unteren Fornixbereich findet [12]. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass konjunktivale Epithelzellen und Becherzellen von gemeinsamen Progenitorzellen stammen und dass konjunktivale Epithelzellen zu Becherzellen ausdifferenzieren können [13].

## **1.2 Bindehautrekonstruktion**

### **1.2.1 Indikationen für eine Bindehautrekonstruktion**

Die beschriebenen intakten konjunktivalen Strukturen und Schutzmechanismen können auf vielerlei Weise geschädigt werden. Nennenswert sind in diesem Zusammenhang verschiedene Traumata wie mechanische Verletzungen, Verbrennungen oder Verätzungen, aber auch die Konjunktiva betreffende Autoimmunerkrankungen wie das okuläre vernarbende Pemphigoid oder das Stevens-Johnson-Syndrom [14, 15]. Ebenso können bindehauteigene Pathologien wie degenerative (z.B. Pterygium) oder neoplastische benigne und maligne Bindehautveränderungen mit einer Beeinträchtigung der Bindehautphysiologie einhergehen und durch eine Stammzelldefizienz ihre Regenerationsfähigkeit limitieren [16, 17]. Die beschriebenen Erkrankungen können durch gestörte und verzögerte Heilungsprozesse zu Vernarbungen, Fornixverkürzung und zu Symblephara, d.h. Verwachsungen von palpebraler und bulbärer Konjunktiva, führen und dadurch nicht nur die Bulbusmotilität behindern, sondern ebenfalls durch Störungen des Lidschlusses und Entzündungsreaktionen die Integrität der Kornea stören [15]. Komplikationen sind der Visusverlust bis hin zum Verlust des Auges. Bei besonders schwerer Schädigung der Augenoberfläche kann neben grundlegenden Maßnahmen zur Symptomlinderung, wie der Vorbeugung von weiterer Austrocknung und Entzündungsprogredienz, die chirurgische Rekonstruktion der Konjunktiva und der Fornices indiziert sein und einen wichtigen Schritt bei der Wiederherstellung einer intakten Augenoberfläche darstellen [18]. In Abhängigkeit von der spezifischen Pathologie und ihren Ausmaßen reicht der Bindehautersatz von kleinen Defektdeckungen bis zu einer großflächigen Rekonstruktion [19].

### **1.2.2 Anforderungen an ein Bindehautersatzgewebe**

In Anbetracht der funktionellen Vielfalt der Konjunktiva sollte ein Bindehautersatzgewebe mehreren speziellen Ansprüchen gerecht werden. Hinsichtlich der Bulbusmotilität sollte es zum einen eine ausreichende mechanische Stabilität besitzen, die der mechanischen Belastung standhalten kann, und zum anderen eine dafür ebenfalls notwendige Elastizität und Dehnbarkeit aufweisen [20, 21]. Darüber hinaus sollte ein Bindehautersatzgewebe biokompatibel sein, d.h. durch eine Eingliederung in das noch vorhandene Gewebe keine ausgeprägten Entzündungs- und Vernarbungsprozesse induzieren, nicht immunogen sein und bestenfalls die Wundheilung unterstützen [21]. Die

Biokompatibilität eines Bindehautersatzgewebes beinhaltet zusätzlich die Möglichkeit einer nachfolgenden Epithelbildung, also einer Reepithelialisierung des Gewebeersatzes [20, 21]. Das Vorhandensein eines Epithels stellt eine wesentliche Bedingung für die vollkommene Gewebeintegration dar und kann wesentlich zur Ausbildung einer intakten Barriere- und Schutzfunktion der anterioren Augengrenze beitragen [4, 7, 22].

### **1.3 Klinisch verwendete Ersatzgewebe und ihre Limitationen**

Ersatzgewebe, die aktuell klinisch im Einsatz sind, sind die humane Amnionmembran (HAM), aber auch autologe Binde-, Mund- und Nasenschleimhaut. Dabei sind die genannten Gewebe nicht beliebig austauschbar und haben jeweils spezifische Vor- und Nachteile, die bei der Wahl des Ersatzgewebes je nach Krankheitsbild zum Tragen kommen. Im Folgenden sollen die wichtigsten Charakteristika der Ersatzgewebe vorgestellt werden.

Ein lange etabliertes Ersatzgewebe stellt die HAM dar, bei der es sich um die innerste Schicht der Plazenta handelt. Bereits im Jahre 1940 wurde die erste Amnionmembrantransplantation (AMT) im Rahmen der Behandlung eines Symblepharons durchgeführt [23]. Deutlich später, in den Jahren 1995 und 1997, wurden Methoden zur Lagerung von HAM beschrieben, die letztlich dazu beigetragen haben, dass ihre chirurgische Anwendbarkeit im klinischen Alltag deutlich vereinfacht werden konnte [24, 25]. Das unter anderem von Lee und Tseng beschriebene Einfrieren von HAM in einem 1:1 zusammengesetzten Lagerungsmedium aus Glycerol und Zellkulturmedium bei -80 °C hat seitdem weite klinische Verbreitung gefunden und wird bis heute angewendet [24]. Die Indikationen für eine AMT sind vielfältig und umfassen die Bindehautrekonstruktion sowie die chirurgische Therapie kornealer Pathologien. Zu den Vorteilen der HAM zählen ihre antiinflammatorischen und vernarbungshemmenden Eigenschaften [26, 27]. Außerdem fördert sie die Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von Epithelzellen [28-30]. Viele dieser Wirkungen sind aus dem Nachweis von spezifischen Zytokinen, Proteasen und antiangiogenetischen Faktoren in der HAM abgeleitet und wurden durch eine Ansammlung postoperativer Beobachtungen gestützt [31].

Trotz der antiinflammatorischen Effekte der HAM weiß man, dass eine stark inflammatorische Umgebung zum frühzeitigen Verlust der HAM führen kann [21], sodass eine AMT in diesen Fällen oft kein zufriedenstellendes postoperatives Ergebnis liefert.

Ein anderer Nachteil der HAM besteht in einem nicht vollständig auszuschließenden Infektionsrisiko. Zwar liegen für die Gewinnung der HAM aus Spenderplazentas spezielle Richtlinien vor, die serologische Testungen des Spendergewebes (auf HIV 1/2, Hepatitis B und C, Syphilis etc.) vorsehen [32], allerdings existieren Infektionskrankheiten (z.B. Prionenerkrankungen wie die Creutzfeld-Jacob-Krankheit), für die keine Testmöglichkeiten bestehen [33]. Weitere unbeeinflussbare Größen stellen inter- und intra-Spendervariabilitäten des Gewebes sowie kaum vermeidbare Unterschiede bereits im Präparationsvorgang der HAM dar [31, 34], sodass je nach Schwangerschaftsdauer und genauem Entnahmeort des Gewebes zwischen HAM verschiedener Spenderinnen, oder aber bereits innerhalb einer einzelnen HAM strukturelle und biomechanische Unterschiede vorkommen können.

Ein weiteres Ersatzgewebe stellt autologe Konjunktiva dar, die sich aufgrund der limitierten Menge hauptsächlich für die Deckung lokal begrenzter Defekte eignet, beispielsweise in der Pterygiumchirurgie [35]. Clearfield et al. zeigten in einem Review, dass die Rezidivraten für primäres und rezidivierendes Pterygium nach Defektdeckung mit autologer Konjunktiva niedriger waren als nach einer Deckung mit HAM [36]. Die Vorteile dieses Gewebes liegen in der gewebespezifischen Beschaffenheit, der fehlenden Immunogenität sowie in der bereits vorhandenen Epithelialisierung. Allerdings muss beachtet werden, dass es auch Kontraindikationen für die Entnahme autologer Konjunktiva gibt. Dies kann bei starkem Entzündungsgeschehen, ausgelöst durch z.B. Autoimmunerkrankungen, der Fall sein. Hier birgt ein chirurgisches Eingreifen das Risiko der Inflammationsverstärkung und übermäßiger Vernarbungsprozesse [21, 37]. Auch bei großen Bindehautdefekten ist ein autologes Transplantat nicht möglich [37].

Autologe Mund- und Nasenschleimhaut stellen weitere Gewebequellen dar. Je nach Anforderung an das Ersatzgewebe kann bei der Entnahme zwischen Schleimhaut aus der Nasen-, Wangen-, Lippen- oder Gaumenregion gewählt werden [38]. Der Vorteil dieser Schleimhäute liegt in dem Vorhandensein von epithelialen Progenitorzellen, die die nachfolgende Epithelialisierung und anschließende Wundheilung beschleunigen können [39]. Durch ihre gute Vaskularisierung, Progenitorzell- sowie Becherzell-dichte ist die Nasenschleimhaut als vorteilhaftes Transplantat bei vernarbenden okulären Erkrankungen, wie dem Stevens-Johnson-Syndrom, dem okulärem Pemphigoid oder nach Verbrennungen und schweren Verätzungen beschrieben [40]. Nennenswerte Nachteile sind die erschwerte Gewebeentnahme insbesondere der nasalen Mucosa und eine limitierte

Gewebemenge. Außerdem muss im Fall einer Beteiligung oraler und nasaler Mucosa bei Autoimmunerkrankungen in der Regel auf alternative Gewebe zurückgegriffen werden. Ein weiterer Nachteil der Verwendung von Mucosa zur Bindehautrekonstruktion ist eine mögliche kosmetische Beeinträchtigung der Patienten aufgrund der stärkeren Vaskularisierung nasaler und oraler Mucosa im Vergleich zur Konjunktiva [40].

## **1.4 Erforschung weiterer Ersatzgewebe zur Bindehautrekonstruktion**

### **1.4.1 Synthetische Ersatzgewebe**

Die Gruppe der synthetischen Ersatzgewebe umfasst eine Vielzahl unterschiedlicher Materialien. Durch Elektrosponnen lassen sich aus Polymeren fasrige Matrices herstellen, die eine Extrazellulärmatrix imitieren können [41]. Zu den synthetischen Polymeren gehört beispielsweise Polytetrafluorethylen (PTFE) [42, 43]. Es handelt sich hierbei um ein nicht absorbierbares, gewobenes Material, dessen poröse Struktur das Einwachsen von Bindegewebe und somit die Integration in das Empfängergewebe vereinfacht. Rekonstruktive Eingriffe mit PTFE bei Patienten mit u.a. Symblephara oder vernarbenden Erkrankungen der Augenoberfläche wurden bereits 1990 beschrieben und zeigten gute postoperative Ergebnisse [44]. Weitere Beispiele sind Polylactid-co-glycolid (PLGA) und Poly- $\epsilon$ -Caprolacton (PCL), für die noch keine Publikationen zur Anwendung am Menschen vorliegen [37].

Ein großer Vorteil ist, dass diese Materialien nach standardisiertem Protokoll und als Medizinprodukte unter Einhaltung von GMP-Richtlinien (*Good Manufacturing Practice*) hergestellt werden können. Je nach spezifischen Anforderungen können strukturelle Eigenschaften einiger Materialien durch Variationen im Herstellungsprozess modifiziert werden [45]. Sie unterliegen nicht der unbeeinflussbaren Variabilität biologischer Gewebe und sind auch unter infektiologischen Gesichtspunkten deutlich weniger riskant [45]. Eine Schwachstelle dieser synthetischen Materialien stellt allerdings ihre geringe Elastizität dar und ebenfalls die Tatsache, dass einige von ihnen nicht biologisch abbaubar sind, was *in vivo* potenziell zu beeinträchtigter Wundheilung und gestörter Integration ins Empfängergewebe führen kann [37]. Auch kann das Zellwachstum auf synthetischen Materialien im Vergleich zu biologischen Substraten limitiert sein [41]. Es ist mehrfach beschrieben, dass die Modifikation dieser Materialien durch biologische Moleküle die Wachstumsbedingungen für Zellen verbessert. So konnten Karesh et al. (1991) zeigen,

dass HCEC auf mit Kollagen beschichtetem PTFE *in vitro* besser proliferierten als auf nicht modifiziertem PTFE [42]. In einer anderen Studie konnten Lee et al. (2003) zeigen, dass durch die Zugabe von Kollagen-, Hyaluronsäure- und HAM-Bestandteilen modifizierte PLGA-Konstrukte *in vitro* eine stärkere Adhäsion und ein besseres Wachstum von Hornhautepithelzellen ermöglichten als nicht vorbehandelte PLGA-Konstrukte [46].

#### **1.4.2 Ersatzgewebe auf der Basis natürlich vorkommender Proteine**

Der Aspekt der Zelladhäsion an Materialien, die mittels Bioengineering produziert wurden, stellt ein weites Forschungsfeld dar. Es ist bekannt, dass physikalische und biochemische Oberflächenmodifikationen sowie EZM-Eigenschaften Auswirkungen auf Zelladhäsion und Zellwachstum haben [47]. Da Zelladhäsion und Proliferation von CEC (*Conjunctival Epithelial Cells*) auf modifizierten synthetischen Oberflächen im Vergleich zu rein synthetischen Materialien erhöht sind, wird verständlich, dass vor allem solche Gewebe von Interesse sind, die auf natürlich im Körper vorkommenden Proteinen basieren.

Das konjunktivale Stroma enthält vor allem Kollagen Typ I, II und III [48]. Erwähnenswert sind deshalb in erster Linie Matrices, die auf diesen Proteinen beruhen. Diese zeichnen sich durch niedrige Immunogenität sowie gute Biokompatibilität aus und können zudem durch Zellen modelliert werden [49].

Ausgehend von Kollagen-Hydrogelen, die einen starken Wassergehalt und eine damit verbundene geringe mechanische Stabilität aufweisen, konnte mittels einer von Brown et al. (2005) entwickelten und auf Wasserentzug basierenden Methode PCC (*Plastic Compressed Collagen*)-Gel hergestellt werden [50]. Diese basiert auf einem schnellen Flüssigkeitsentzug aus Hydrogelen z.B. durch Aufbringen einer mechanischen Last oder von kapillärem Sog auf die poröse Matrix. Das auf diese Weise generierte PCC-Gel zeigte in biomechanischen Messungen sowohl eine hohe Zugfestigkeit als auch eine hohe Elastizität und ließ sich darüber hinaus unter Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels und dem Erhalt von Progenitorzellmarkern erfolgreich mit HCEC rezellularisieren [51].

Neben PCC wird in der Literatur auch Kollagen-Vitrigel als Ersatzgewebe für die Augenoberflächenrekonstruktion beschrieben [52]. Dabei handelt es sich um eine Membran, die in einem dreischrittigen Prozess aus Kollagen Typ I hergestellt werden kann [53]. Die Einzelschritte umfassen eine Gelierung des Kollagens, eine Vitrifikation, d.h. eine Verfestigung durch Wasserentzug, sowie eine Rehydrierung des Gewebes zu einer

transparenten und elastischen Membran [53]. Es konnte gezeigt werden, dass Kollagen-Vitrigel eine geeignete Matrix für das Wachstum von HCEC darstellt und bei konjunktivalen Defektdeckungen im Kaninchen eine gute Biokompatibilität aufwies [54].

Auch andere Proteine können als Basis die Erstellung von Bindehautersatzgeweben herangezogen werden. Ein nennenswertes Beispiel für eine durch 3D-Druck produzierte Matrix, die bereits im Tiermodell evaluiert worden ist, stellt eine durch Dehghani et al. verwendete Membran aus Gelatine, Elastin und Natriumhyaluronat dar [55].

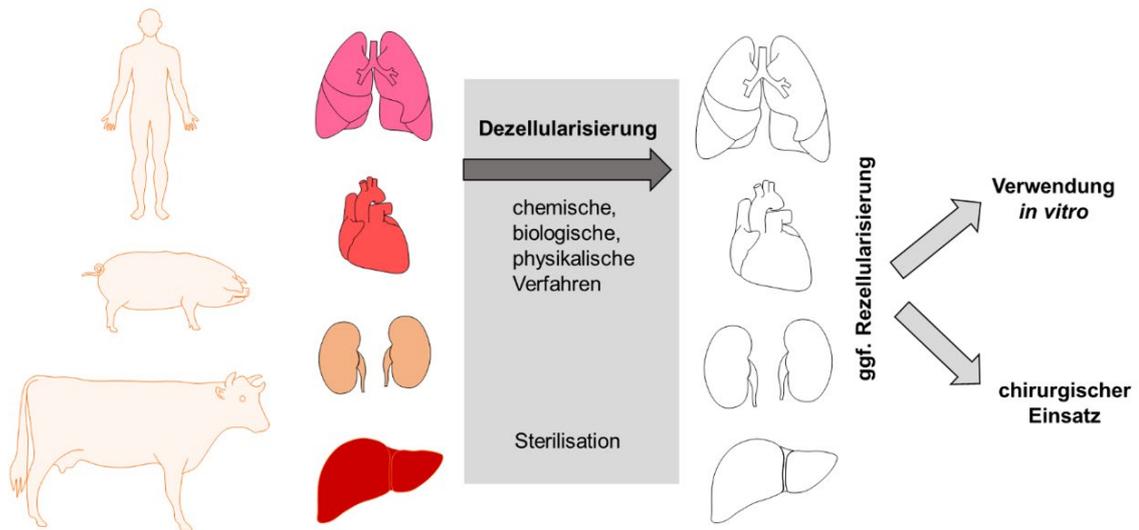
## **1.5 Dezellularisierte Gewebe**

### **1.5.1 Hintergrund und funktionelle Bedeutung der Extrazellulärmatrix (EZM)**

Neben den genannten Materialien eröffnet die Dezellularisierung von tierischen oder menschlichen Ursprungsgeweben vielversprechende Perspektiven für den Gewebeersatz. Dezellularisierung beschreibt dabei einen Vorgang, durch den sich organspezifische EZM nach größtmöglicher Beseitigung von in ihr enthaltenen Zellstrukturen und Antigenen gewinnen lässt. Die Tatsache, dass sich durch dieses Verfahren nicht nur kleinere Gewebefragmente, sondern auch ganze Organe behandeln lassen [56, 57], macht diese Methode zu einem breit erforschten Feld im Bereich des Tissue Engineering und der regenerativen Medizin (Abb. 3).

Der strukturellen und funktionellen Integrität der organspezifischen EZM kommt in diesem Kontext eine große Bedeutung zu. In den letzten Dekaden wurde immer deutlicher, dass der einst als bloßes Füll- und Trägergewebe unterschätzte Zellzwischenraum organotypische Gewebespezifitäten aufweist und darüber hinaus mit den ihn umgebenden Zellen sowohl biochemisch als auch mechanisch interagieren kann.

Auf Molekülebene betrachtet ist die EZM aus Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen sowie Glykoproteinen – allen voran Kollagen – aufgebaut [58, 59]. Die präzise biochemische Zusammensetzung definiert nicht nur die bereits makroskopisch sichtbare Gewebestruktur und die biomechanischen Eigenschaften des Gewebes, sondern unterscheidet sich auch auf molekularer Ebene deutlich im Hinblick auf die Spezifität und Diversität von Bindungsstellen für die in ihr enthaltenen Zellen. Letztere besitzen auf ihrer Oberfläche je nach Zelltyp ein spezifisches Muster an Transmembranproteinen (z.B. Integrine



**Abb. 3: Grundprinzip der Dezellularisierung tierischer und menschlicher Gewebe.**

und Syndekane), mit denen die Moleküle der EZM interagieren und auf diese Weise Einfluss auf Zelladhäsion, Zellpolarität, Zellmigration und intrazelluläre Signalwege nehmen können [58, 60]. Daraus ergibt sich, dass die EZM v.a. bei Gewebeneubildungen, zum Beispiel innerhalb der Embryogenese und bei Wachstums- oder Wundheilungsprozessen, aber auch innerhalb pathologischer Prozesse, wie der Tumorentstehung und Metastasierung, eine entscheidende Rolle einnimmt [61].

Es ist zudem bekannt, dass die EZM durch in ihr enthaltene Zytokine und Wachstumsfaktoren auf Zellprozesse einwirken kann, indem sie ein Reservoir an regulatorischen Proteinen, die die Proliferation und Differenzierung von Zellen steuern können, darstellt und darüber hinaus eine gleichmäßige Verteilung dieser Proteine entlang eines chemischen Gradienten ermöglicht [62]. Bei einigen Wachstumsfaktoren weiß man, dass diese erst durch Integrin-vermittelte Zelladhäsion und Zell-Matrix-Interaktionen wirksam werden können. Gleichzeitig können sie aber auch eine Rückwirkung auf die Struktur der EZM provozieren, indem sie die Zellen zur Produktion von EZM-Komponenten oder deren Abbau anregen [62].

An dem Abbau von EZM-Komponenten und speziellen Modifikationen an der Matrix sind Matrix-Metallo-Proteinase beteiligt, die wesentlich für den Erhalt einer funktionalen Matrixstruktur sorgen und die ebenfalls in der Lage sind, durch proteolytische Prozesse Wachstumsfaktoren und Zytokine freizusetzen [63].

Einen weiteren Aspekt stellt die Mechanotransduktion dar. Sie beschreibt den Einfluss mechanischer Reize auf intrazelluläre biochemische Signalwege sowie die Genexpression und basiert auf der Wahrnehmung von Krafteinwirkungen durch mechanosensorische Strukturen der Zellen (z.B. interzelluläre- und Zell-Matrix-Adhäsionszonen, intrazelluläre Filamente) [64, 65].

Die beschriebenen Mechanismen zeigen, wie durch die EZM Zellprozesse auf vielfältige Weise beeinflusst werden können. Frisch und Francis konnten 1994 nachweisen, dass der bloße Interaktionsverlust zwischen Epithelzellen und der EZM zu einer Apoptoseinduktion in diesen Zellen führen kann [66]. Dabei sind diese Mechanismen keineswegs auf native EZM beschränkt. Auch innerhalb dezellularisierter EZM sind die Auswirkungen der molekularen Umgebung zu beobachten [67, 68].

Vor diesem Hintergrund wird verständlich, dass dezellularisierte Gewebe eine geeignete Wachstumsfläche für eine nachfolgende organspezifische Rezellularisierung bieten können. Letztere verfolgt das Ziel, die organotypische Funktionalität wiederherzustellen und hat sich in zahlreichen Studien für verschiedene tierische und menschliche Organe *in vitro* als möglich erwiesen [69, 70]. Es konnte gezeigt werden, dass dezellularisierte tierische Gewebe mit humanen Zellen rezellularisierbar sind [71]. Vor allem die mögliche präoperative Rezellularisierung des Ersatzgewebes mit autologen Zellen eines potenziellen Transplantatempfängers im Sinne einer „personalisierten“ Gewebekonstruktion eröffnet neue Perspektiven in der Transplantationsmedizin [72].

### **1.5.2 Dezellularisierungsverfahren**

Ein optimaler Dezellularisierungsvorgang vereint die Ansprüche, Zellbestandteile und insbesondere nukleäre Strukturen weitestgehend zu entfernen und dabei die Struktur und Funktionalität der EZM bestmöglich zu erhalten [57].

Je nach ursprünglicher Gewebecharakteristik (Zellreichtum, Dicke, Dichte, Fettgehalt) kann bei dem Dezellularisierungsvorgang auf eine breite Methodenvielfalt zurückgegriffen werden. Neben chemischen Agenzien (Säuren, Basen, hypertone und hypotone Lösungen, Detergenzien, Alkohole) finden auch biologische (enzymatische und nicht-enzymatische) sowie physikalische Methoden (z.B. multiple Einfrier-Auftau-Zyklen) Verwendung [57]. Die zu dezellularisierenden Gewebe können dabei entweder mit den Agenzien von außen umspült, oder aber im Falle größerer parenchymatöser Organe entlang

eines bereits bestehenden Gefäßsystems perfundiert werden [73]. So lässt sich bei größeren Geweben die Organarchitektur erhalten und die Dezellularisierung dennoch effektiv durchführen.

Obwohl unter quantitativen Gesichtspunkten keine strikte Definition dezellularisierter Gewebe existiert, kann eine Quantifizierung des nachträglich noch vorhandenen Gehalts an DNA, Mitochondrien sowie membranassoziierten Strukturen wie Phospholipiden einen Anhalt für die Effektivität der Dezellularisierung geben [57]. Basierend auf mehreren *in vivo*-Studien zu dezellularisierten Geweben, die ohne nachfolgende Abstoßungsreaktion transplantiert wurden, werden in einer Übersichtsarbeit von Crapo et al. Obergrenzen für verbliebene Zellstrukturen in dezellularisierten Geweben genannt (< 50 ng dsDNA/mg EZM, < 200 bp DNA-Fragmentlänge, keine Anfärbbarkeit nukleärer Komponenten in histologischen Färbungen) [57]. Auch wenn eine vollständige Entfernung jeglicher Zellstrukturen nicht möglich ist, sollte ihre Menge im Hinblick auf eine mögliche immunologische Reaktion im Transplantatempfänger prinzipiell auf das mögliche Minimum reduziert werden [57].

Einen weiteren Schritt nach der Dezellularisierung stellt die Sterilisation des Gewebes dar. Diese ist vor allem vor einem Einsatz des Gewebes *in vivo* von Bedeutung. Für die Sterilisation können verschiedene Substanzen bzw. Verfahren zum Einsatz kommen, z.B. Säuren, Lösungsmittel – darunter auch überkritisches Kohlenstoffdioxid –,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Strahlung [57].

### **1.5.3 Beispiele für die klinische Anwendung dezellularisierter Konstrukte**

Die Verwendung dezellularisierter Gewebe in der klinischen Praxis kann im Vergleich zu anderweitigen Gewebetypen entscheidende Vorteile bieten: Zum einen kann das auf diese Weise generierte Ersatzgewebe die organspezifischen Gewebeeigenschaften bei schonender Dezellularisierungstechnik optimal imitieren. Zum anderen ist das Nativgewebe, sofern es tierischen Ursprungs ist, leicht und in großen Mengen verfügbar.

Dezellularisierte Gewebe wurden bereits fächerübergreifend in der Patientenversorgung eingesetzt. Beispiele dafür sind humane oder porcine (= vom Schwein stammende) azelluläre dermale Matrix (z.B. AlloDerm®) [74-76], dezellularisierte xenogene Herzklappen [77] oder osteochondrale Allografts [78].

Bei AlloDerm® handelt es sich beispielsweise um eine kommerziell erhältliche azelluläre dermale Matrix humanen Ursprungs. Die Verwendung dieses Gewebes ist unter anderem für Hautrekonstruktionen nach Brandverletzungen [79], Brust- [80] und Bauchwandrekonstruktionen [81] sowie rekonstruktive Eingriffe der Trachea [82] oder des Urogenitaltraktes [83] beschrieben. AlloDerm® wird in der Literatur auch im Zusammenhang mit okuloplastischen Eingriffen, wie beispielsweise bei Korrekturen von Unterlidretraktion, Füllungen der oberen Lidfurche oder der Versorgung von periorbitalen Hautdefekten genannt [84, 85]. Park et al. beschrieben die Anwendung von AlloDerm® für die Schließung von Bindehautdefekten und die Verstärkung insuffizienter Konjunktiva nach Eviszation (= Entfernung des Augeninneren unter Belassung der Sklera) an sechs Augen [86]. Bei allen Patienten zeigten sich die Transplantate im Verlauf (im Median nach 11 Wochen) von Empfängerkonjunktiva bedeckt.

Eine Besonderheit stellt die zuvor genannte Rebesiedelung dezellularisierten Gewebes mit autologen Zellen des Transplantatempfängers dar. Angaben zur Verwendung diverser autolog rezellularisierter Biomaterialien als klinische Transplantate finden sich bereits mehrfach in der Literatur [87-89]. Macchiarini et al. beschrieben bei einer von Bronchomalazie betroffenen 30-jährigen Patientin die Transplantation eines 7 cm langen Segments allogener dezellularisierter humaner Spendertrachea, die zuvor mit autologen Epithelzellen der Gewebeempfängerin rezellularisiert worden ist [90]. Bei der Patientin ergab sich bis zum maximal genannten Beobachtungszeitraum von vier Monaten kein Hinweis auf eine Abstoßungsreaktion und das Transplantat zeigte sich bei den Nachuntersuchungen gut in das Empfängergewebe integriert.

#### **1.5.4 Herausforderungen bei der Entwicklung und Anwendung dezellularisierter Gewebe**

Neben den vielversprechenden Forschungsergebnissen zu dezellularisierten Geweben bringt ihre Entwicklung und Verwendung auch Herausforderungen mit sich, die im Folgenden in Kürze genannt werden [69, 91].

Zum einen thematisieren Hussein et al. in einem Review zur Biokompatibilität dezellularisierter Konstrukte die Möglichkeit des Verbleibs von dezellularisierenden Agenzien im Gewebe. In dem Zusammenhang wird eine mögliche Zytotoxizität, die sich trotz mehrmaliger Waschschrte auch durch geringe Mengen verbliebener Chemikalien ergeben kann, diskutiert [92].

Zum anderen kann auch die Wahl des Sterilisationsverfahrens je nach Gewebetyp unterschiedliche Auswirkungen auf das dezellularisierte Gewebe haben und seine Gewebestruktur und Biokompatibilität beeinflussen [91, 92]. Als Komplikationen können dabei eine unzureichende Gewebepenetration (z.B. bei Säuren und Lösungsmitteln) sowie Veränderungen der EZM-Ultrastruktur und -biomechanik auftreten (z.B. nach  $\gamma$ -Strahlung) [93, 94]. Die Auswahl einer geeigneten Sterilisationsmethode sollte daher bei der Entwicklung dezellularisierter Konstrukte gewebespezifisch geprüft werden.

Als mögliche Gewebequelle für Xenotransplantate steht besonders porcines Gewebe im Vordergrund, da Schweine vergleichsweise einfach zu züchten sind und ihre Organgröße mit der menschlichen vergleichbar ist [95]. Dennoch besteht hier grundsätzlich das Risiko einer Übertragung von Krankheitserregern auf den Menschen [92]. Vielfach erwähnt werden dabei porcine Viren, u.a. das porcine endogene Retrovirus (PERV) [95]. So konnte PERV-DNA in azellulärer porciner Matrix (Pulmonalarterien) nachgewiesen werden [96]. Nach heutigem Kenntnisstand ist bisher allerdings keine humane Infektion auf porcines dezellularisiertes Gewebe zurückzuführen [92].

Neben einer möglichen Infektiosität stellt vor allem die Immunogenität dezellularisierter Gewebe einen wichtigen Aspekt dar. Es wird davon ausgegangen, dass u.a. verbliebene DNA für Immunreaktionen im Empfängerorganismus verantwortlich ist [91]. In Zusammenschau mehrerer Studien konnte gezeigt werden, dass nach Dezellularisierung porciner Matrices bis zu 2 % nativer DNA im Gewebe nachweisbar waren [92]. Eine effektive Dezellularisierung bei bestmöglichem Erhalt der EZM stellt dabei einen Balanceakt dar. Neben DNA ist auch alpha-Gal (Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-R), ein Epitop auf der Zelloberfläche vieler Säugetiere, als potenzieller Auslöser einer Immunreaktion im Rahmen einer Xenotransplantation bekannt [92]. Ein Ansatz zur quantitativen Messung der Reduktion von alpha-Gal durch Dezellularisierung wurde durch Naso et al. beschrieben [97].

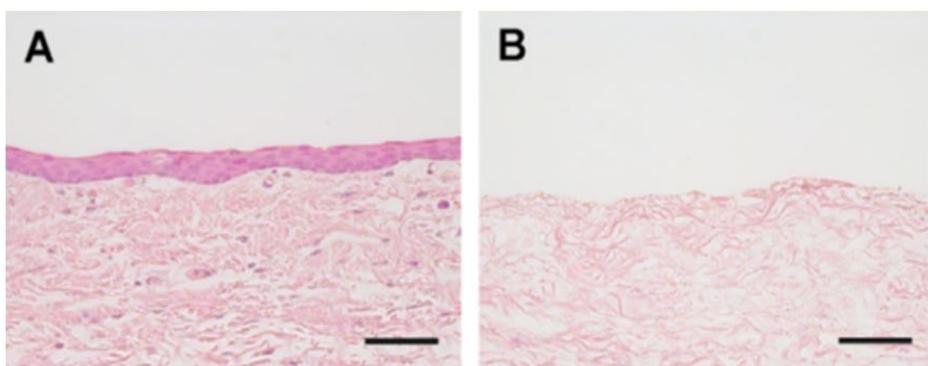
Andere Herausforderungen ergeben sich im Kontext der Rezellularisierung. Es ist bekannt, dass dezellularisierte Matrices Zellmigration fördern können und durch Zellrekrutierung eine Rezellularisierung von endogen (vom Empfängergewebe) bis zu einem bestimmten Ausmaß möglich ist [91]. Dennoch ist gerade bei komplexen Organen eine exogene Rezellularierungsquelle nötig. Die Gewinnung der erforderlichen Zellmengen sowie die Art und Weise der Applikation dieser Zellen zu den Matrices (Perfusion, Injektion

etc.) können eine Schwierigkeit darstellen [91]. Im Hinblick auf ihre metabolischen Anforderungen bei zum Teil diversen Zellpopulationen und der Optimierung von Kultivierungsbedingungen bedürfen solche Zell-Matrix-Konstrukte noch weiterer Erforschung (z.B. Kultivierungsdauern, Zusammensetzung von Zellmedien, Bioreaktoren) [91].

## 1.6 Dezellularisierte Konjunktiva

### 1.6.1 Etablierung eines Dezellularisierungsverfahrens für Konjunktiva

Auch für die Bindehautrekonstruktion werden dezellularisierte Konstrukte erforscht. Witt et al. konnten sowohl für porcine als auch für humane Konjunktiva (PK bzw. HK) eine effektive und gewebeschonende Dezellularisierungstechnik etablieren und haben dafür die generierten dezellularisierten Konstrukte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im Kaninchenmodell evaluiert [98, 99]. Der verwendete Dezellularisierungsprozess basiert unter anderem auf der Behandlung der Konjunktiven mit Natriumdesoxycholsäure (NaDC) und boviner pankreatischer DNase. Das genannte Dezellularisierungsprotokoll wird im Methodenteil dieser Arbeit präzise beschrieben. *In vitro* konnte mittels histologischer Untersuchung und DNA-Quantifizierung gezeigt werden, dass sowohl PK als auch HK nach Dezellularisierung (PDK bzw. HDK) zellfrei waren und im Vergleich zur jeweiligen nativen Konjunktiva eine signifikante Reduktion des DNA-Gehaltes aufwiesen. Weder PDK noch HDK zeigten zytotoxische Effekte auf 3T3-Fibroblasten und HCEC. Strukturelle und funktionelle Eigenschaften der Konjunktiva blieben nach Dezellularisierung erhalten: Während sich zwar in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung verglichen mit nativer porciner Konjunktiva eine leichte Gewebeauflockerung zeigte (Abb. 4), konnten



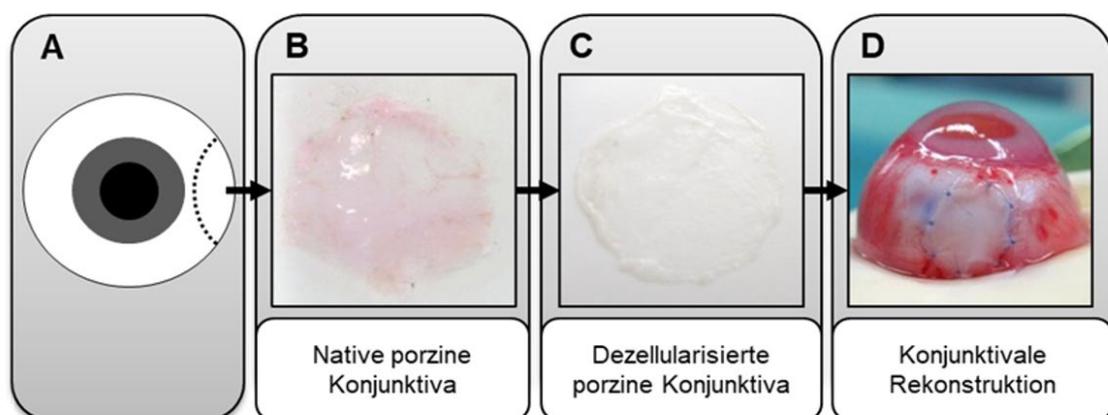
**Abb. 4: Histologische Darstellung porciner dezellularisierter Konjunktiva vor (A) und nach (B) Dezellularisierung in Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Maßstab = 50  $\mu$ m; Abb. modifiziert nach: Witt et al. [98] mit freundlicher Genehmigung des Verlages.**

ultrastrukturell keine deutlichen Schädigungen der Kollagenbündel nachgewiesen werden. Der Dezellularisierungsprozess führte zu keiner signifikanten Reduktion des Kollagengehaltes.

In Gegenüberstellung zur HAM zeigten die DK *in vitro* sowie *in vivo* einige bedeutsame Vorteile. So wiesen die DK bei der Evaluation der Biomechanik im Vergleich zur HAM eine höhere Elastizität und Dehnbarkeit auf, was zum einen die chirurgische Handhabbarkeit und zum anderen *in vivo* eine flexible Bulbusmotilität gewährleistet. Die Anwendung der DK bei konjunktivalen Defekten im Kaninchenmodell ergab bei histologischer Untersuchung der Wundränder im Vergleich zur HAM eine bessere Integration der DK in das Empfängergewebe und signifikant weniger Nahtinsuffizienzen [98] (Abb. 5). Sowohl PDK als auch HDK waren zehn Tage nach Transplantation von einem stratifizierten Epithel bedeckt.

Auch eine weitere Arbeitsgruppe beschrieb HDK als ein potenzielles Ersatzgewebe für die Bindehautrekonstruktion [100]. Kasbekar et al. entwickelten eine Dezellularisierungstechnik, die ebenfalls auf der Verwendung eines Detergens und einer Nuklease basiert. Auch hier ließ sich nach Dezellularisierung ein zellfreies, nicht zytotoxisches Gewebe gewinnen, bei dem sich im Hinblick auf seine Biomechanik und seinen Kollagengehalt keine signifikanten Abweichungen bzw. Reduktion zum nativen Gewebe feststellen ließen.

In einem weiteren von Zhao et al. beschriebenen Verfahren wurde mit hydrostatischem Druck und Ultraschall gearbeitet. Die auf diese Weise generierten PDK wurden bereits bei drei Patienten mit Pterygium und einem Patienten mit Symblepharon angewendet. Bei



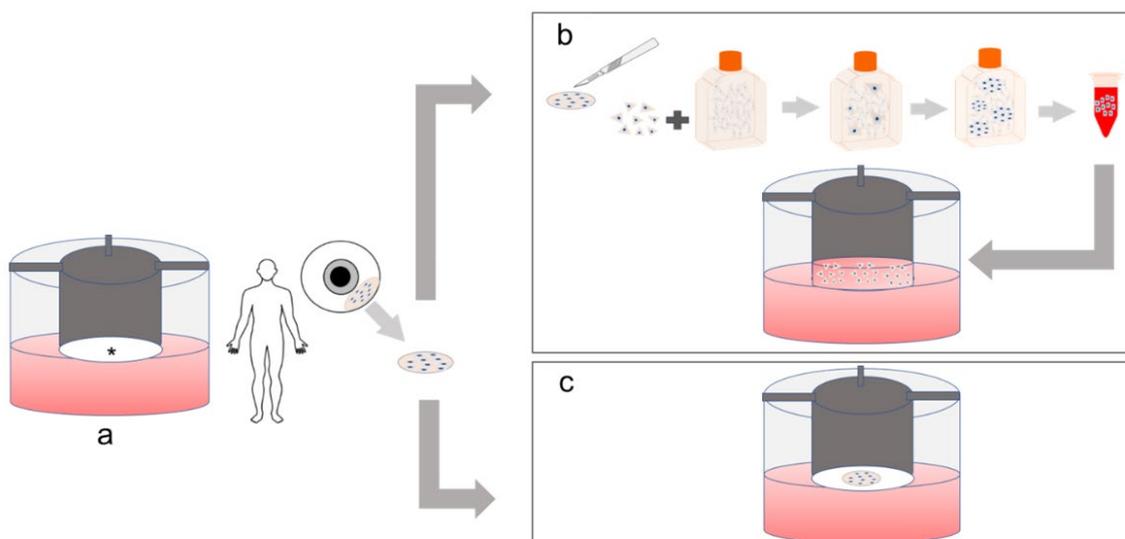
**Abb. 5: Dezellularisierung porciner Konjunktiva und Bindehautrekonstruktion im Kaninchenmodell;** Abb. modifiziert nach: Witt et al. [98] mit freundlicher Genehmigung des Verlages.

allen Patienten zeigte sich das Transplantat zwei Wochen nach dem chirurgischen Eingriff epithelialisiert. Eine Transplantateinschmelzung oder -vernarbung wurden im Verlauf nicht beobachtet [101].

### 1.6.2 Vorarbeiten zur Reepithelialisierung dezellularisierter Konjunktiva

Kasbekar et al. gelang der Nachweis einer Reepithelialisierung von HDK *in vitro* [100]. Die Arbeitsgruppe arbeitete dafür mit humanen konjunktivalen Explantstücken, d.h. Fragmenten von (bulbärer) Konjunktiva, die für 28 Tage auf in Zellkronen eingespannten HDK kultiviert wurden. Die Medienzugabe erfolgte bis Tag 11 von apikal und basal, ab Tag 12 nur von basal („*air-lifting*“) zur Förderung der Epithelstratifizierung. Nach der genannten Kultivierungsdauer zeigte sich auf allen rezellularisierten HDK ein zwei- bis vierschichtiges Epithel und immunhistochemisch ein konjunktivaspezifisches Anfärbungsmuster (Zytokeratine 19, 7 und 4) [100].

Witt et al. konnten zeigen, dass sich auch PDK mit primären HCEC rezellularisieren ließ [99]. Als Zellquelle wurden entweder zuvor in Kokultur mit murinen wachstumsarretierten 3T3-Fibroblasten expandierte HCEC in Suspensionskultur, oder Explantstücke humaner bulbärer Konjunktiva von 1 mm Durchmesser verwendet (s. Abb. 6). Erstere sind vor der Expansion aus humaner Konjunktiva kultiviert und kryokonserviert worden. Die Explantstücke wurden mit der nach unten gerichteten Basalmembran auf die PDK



**Abb. 6: Vereinfachte Darstellung von Rezellarisierungsmethoden von porziner dezellularisierter Konjunktiva (PDK) nach Witt et al [99]. (a) In einem Well hängende Zellkrone mit eingespannter PDK (\*) und Zellmedium von basal; (b) Kokultivierung humaner konjunktivaler Epithelzellen (HCEC) mit murinen 3T3-Fibroblasten, Ablösung von HCEC aus der Zellkulturflasche und Suspensionskultur von HCEC auf PDK; (c) Explantkultur eines Fragmentes nativer humaner Konjunktiva auf PDK.**

aufgetragen. Die Kultivierungsdauer in Zellkronen betrug für beide Gruppen maximal 24 Tage. Bis Tag 7 erfolgte die Zugabe von Zellmedium von apikal und basal, danach nur von basal zur Ermöglichung einer besseren Epithelstratifizierung. Mit beiden Methoden ließ sich ab Tag 14 die Ausbildung eines stabilen und stratifizierten Epithels mit immunhistochemischer Expression von konjunktivalen Progenitorzellmarkern auf PDK nachweisen. PDK, die mit Explantstücken rezellularisiert worden waren, wiesen ab Tag 14 eine signifikant höhere Epitheldicke sowie zu jedem gemessenen Zeitpunkt (Tag 7, 14, 24) eine bessere Epithelstratifizierung auf. Die Ausbildung von Becherzellen wurden nur in der Explantkulturmethode (ab Tag 14) beobachtet, aber zu keinem Zeitpunkt nach Rezellularisierung der PDK mit HCEC in Suspensionskultur. Die Autoren der Studie diskutieren diesbezüglich eine zu kurze Kultivierungsdauer sowie bessere Nischenbedingungen für konjunktivale Progenitorzellen in den Explantstücken als mögliche Ursachen.

Die Transplantation von mit humanen Explantstücken rezellularisierter PDK an Tag 14 zeigte nach Transplantation in konjunktivalen Defekten von sechs Kaninchen bis zu einem Beobachtungszeitraum von zehn Tagen weiterhin ein stabiles, mehrschichtiges Epithel mit hohem Erhalt der Stammzeleigenschaften und sekretorischer Kapazität [99].

### **1.7 Lagerung dezellularisierter Gewebe**

Dezellularisierte Gewebe werden zunehmend erforscht und in der klinischen Praxis verwendet. Allerdings ist die Datenlage zur längerfristigen Lagerung dieser Gewebe spärlich. Für einen perspektivisch ausgeweiteten und vereinfachten klinischen Gebrauch dieser Biomaterialien ist eine längerfristige Aufbewahrungsmöglichkeit unabdingbar.

Die Anforderungen an eine geeignete Lagerungsmethode sind dabei mit denen des Dezellularisierungsvorgangs zu vergleichen und beinhalten insbesondere die Erhaltung der EZM-Struktur: Darunter fallen die Konservierung der Gewebearchitektur, die Beibehaltung biochemischer Gewebeeigenschaften, d.h. des Gehalts von struktur- und funktionsgebenden Molekülen der EZM wie des Kollagens und Elastins sowie der Erhalt der Biomechanik. Den vielfältigen Eigenschaften der EZM kommt als Zellnische eine besondere Bedeutung zu, zumal eine gut konservierte EZM die Mikroumgebung der Zellen beeinflusst und wichtige Voraussetzungen für mögliche Zelladhäsion, -viabilität, -proliferation und -migration schafft [67, 68].

Studien zur Lagerung dezellularisierter Gewebe sind in der Literatur meist nur in Bezug auf einzelne Gewebe und in einem Vergleich verschiedener Lagerungsmethoden beschrieben. Neben der Wahl des Lagerungsmediums stellen die Lagerungstemperatur und der Lagerungszeitraum wichtige Variablen dar.

So werden in der Literatur Lagerungen in PBS bei 4 °C erwähnt. Die Pufferlösung besitzt annähernd den pH-Wert menschlicher Zellen und findet breite Verwendung in der Grundlagenwissenschaft. Baiguera et al. beschrieben eine Lagerung von dezellularisierter humaner Trachea in PBS für ein Jahr [102]. Urbani et al. untersuchten dezellularisierten Kaninchenösophagus nach einer solchen Lagerung für sechs Monate [103]. Beide Arbeitsgruppen stellten nach dem maximalen Beobachtungszeitraum eine aufgelockerte EZM-Architektur mit Faserabbrüchen und biomechanische Veränderungen im Sinne einer Reduktion der Zugfestigkeit fest. In beiden Studien wird die Lagerung in PBS daher mehr als kurzfristige Lagerungsmöglichkeit für dezellularisiertes Gewebe diskutiert.

Auch das Einfrieren von dezellularisiertem Gewebe wurde mehrfach beschrieben [103-106]. Hierbei können unterschiedliche Methoden zum Einsatz kommen, die sich in der Wahl der Gefriertemperatur sowie der Zusammensetzung des Gefriermediums (BasalmEDIUM, Wahl des Kryoprotektivums, ggf. weitere Zusätze wie z.B. fetales bovines Serum) unterscheiden. Als eine Unterform des Einfrierens gilt die Kryokonservierung, die definitionsgemäß das Einfrieren in Flüssigstickstoff beschreibt [107]. In der Regel werden den Gefriermedien Kryoprotektiva zugefügt, deren Wirkung auf dem Schutz der Proteine vor Denaturierung und der Reduktion einer Bildung von Eiskristallen beruht. Letztere können während des Einfrierprozesses im Gewebe entstehen und dieses schädigen [107]. Als Kryoprotektiva für die Lagerung von Geweben haben sich u.a. Glycerol und Dimethylsulfoxid (DMSO) etabliert. Bei beiden handelt es sich um zellpermeable Substanzen. Die Schutzwirkung dieser Moleküle spielt sich dabei nicht nur auf Zellebene ab, sondern umfasst auch die EZM [108]. Eine Kryokonservierung in DMSO-haltigen Kryomedien wurde unter anderem für dezellularisierten Kaninchenösophagus [103], dezellularisiertes humanes bovines (= vom Rind stammendes) Perikard [104, 109], Maushoden [105] sowie porcine azelluläre Herzklappen [110, 111] beschrieben. Eine verbreitete Methode stellt hierbei das „*slow-freezing*“ dar, bei der eine anfängliche Temperaturabsenkung um -1 °C/min vor der Überführung in Flüssigstickstoff stattfindet. Mehrere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass sich durch Kryokonservierung die EZM-Architektur und die Strukturfasern dezellularisierter Gewebe für mindestens sechs Monate konservieren lassen [103-105].

Grundsätzlich existieren für den optimalen Konservierungszeitpunkt keine einheitlichen Empfehlungen. Die Möglichkeit einer der Dezellularisierung vorangehenden Kryokonservierung wurde in der Literatur am Beispiel verschiedener Gewebe diskutiert und lieferte unterschiedliche Ergebnisse. So zeigte sich beispielsweise für azelluläre porcine Herzklappen hinsichtlich des Gewebeerhalts der Vorteil einer zuerst erfolgenden Dezellularisierung [112], während in einer anderen Studie Rattennieren, die nach Kryokonservierung dezellularisiert worden waren, ebenso erfolgreich rezellularisiert werden konnten wie entsprechendes frisch dezellularisiertes Gewebe [113].

Eine weitere Lagerungsmethode stellt die Gefriertrocknung dar, die einen auf Sublimation beruhenden Wasserentzug aus gefrorenem Gewebe beschreibt [104, 106, 114, 115]. Gefriertrocknung ermöglicht eine Lagerung bei Raumtemperatur, sodass Lagerungskosten reduziert und Transportprozesse vereinfacht werden können [116]. Livesey et al. beschrieben beispielsweise eine mehrschrittige Gefriertrocknung azellulärer porciner dermaler Matrix bis zu einem Flüssigkeitsgehalt von weniger als 3 %. Zu jedem Zeitpunkt zeigten sich die EZM-Struktur erhalten und die Kollagenbündel intakt. Die rehydrierte Matrix wurde in die Subkutis von zehn Ratten implantiert und zeigte keine Zelltoxizität. Zudem wurden eine nachfolgende Infiltration mit Empfängerfibroblasten und eine Vaskularisierung der allogenen Matrix beobachtet [114]. Allerdings untersuchten bisher nur wenige Studien die Anwendung dieser Methode auf dezellularisierte Gewebe. In einigen Arbeiten wurden Schädigungen der EZM-Architektur durch einige Verfahren der Gefriertrocknung genannt [116, 117], die weitere Prozessmodifikationen erforderten [104, 117, 118]. Darüber hinaus konnten Bottino et al. an azellulärer dermaler Matrix zeigen, dass verschiedene Rehydrierungszeiten einen Einfluss auf die strukturellen und biomechanischen Eigenschaften des Gewebes haben können [115].

## **1.8 Ziele der Arbeit**

Möglichkeiten zur Lagerung dezellularisierter Gewebe können ihre weitere Erforschung und ihren klinischen Einsatz vereinfachen. Dabei sind Unterschiede in der Beschaffenheit der EZM verschiedener Gewebe und Organe je nach Gewebeart und Lokalisation [119] zu berücksichtigen. Es ist davon auszugehen, dass der Einfluss unterschiedlicher Lagerungsbedingungen auf dezellularisierte Gewebe und deren EZM variiert und für jedes

dezellularisierte Gewebe individuell untersucht und definiert werden sollte. Bisher existieren keine Studien zu einer längerfristigen Lagerung von PDK.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit soll der Einfluss verschiedener Lagerungsbedingungen auf den EZM-Erhalt und die Rezellularisierungskapazität von PDK untersucht werden. Die hier verwendeten Lagerungsmethoden unterscheiden sich in der Wahl des Lagerungsmediums, der Lagerungstemperatur sowie des -zeitraumes und werden im Methodenteil dieser Arbeit näher erläutert. Sie orientieren sich dabei an den im Vorfeld zitierten und häufig für dezellularisierte Gewebe in der Literatur beschriebenen Lagerungsmethoden.

Neben der Lagerung von PDK in PBS bei 4 °C und der Kryokonservierung in Flüssigstickstoff stellt eine der Lagerungsmethoden dieser Studie das Einfrieren von PDK unter Verwendung von Glycerol dar. Letztere Methode wurde dabei in Anlehnung an die in der klinischen Praxis bereits etablierte und weit verbreitete Lagerungsmethode von HAM gewählt [24], die das aktuell am häufigsten verwendete Ersatzgewebe zur Bindehautrekonstruktion darstellt.

Die im Anschluss an die Lagerung untersuchten Parameter der PDK decken dabei folgende Aspekte ab:

- Die Struktur und Ultrastruktur der EZM als Zellenische, die EZM-Dichte und die Intaktheit und Integrität der Kollagenfibrillen
- Die Erhaltung der EZM-Proteine: Quantifizierung des Kollagen- und Elastingehalts
- Die biomechanischen Eigenschaften: Elastizität, Zugfestigkeit und maximale Dehnbarkeit
- Die Rezellularisierungskapazität der PDK mit HCEC unter dem Erhalt von Progenitorzelleigenschaften und der Bildung eines mehrschichtigen Epithels.

## 2. Material und Methodik

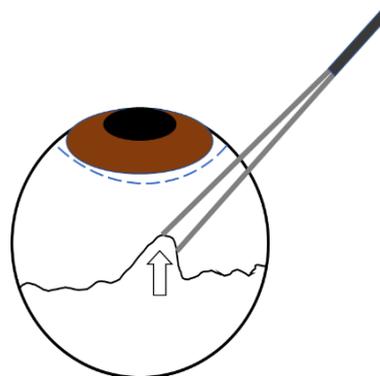
### 2.1 Gewinnung von porziner dezellularisierter Konjunktiva (PDK)

#### 2.1.1 Präparation und Dezellularisierung porziner Konjunktiva

Im ersten Schritt wurden PK für die anschließende Dezellularisierung präpariert. Die hierfür benötigten Augen wurden unmittelbar nach der Schlachtung entnommen. Die Schweine (*Sus scrofa domesticus*) waren zum Zeitpunkt der Schlachtung circa sechs Monate alt. Die Spenderaugen wurden innerhalb einer Stunde gekühlt ins Labor transportiert, als Transportmedium wurde phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) ohne Zusätze verwendet.

Die Gewinnung der Konjunktiva erfolgte nach folgender Vorgehensweise (Abb. 7): Nach zirkulärem Einschneiden und Abtrennen der bulbären Konjunktiva wurde diese mit einer anatomischen Pinzette zirkulär mittels kleiner Schere von der Tenon abpräpariert und dann vom Limbus abgetrennt.

Nach der Präparation wurden die Konjunktiven jeweils dreimal mit PBS unter Zugabe von Antibiotika (1 % Penicillin und Streptomycin = P/S, Sigma Aldrich) gewaschen. Im Anschluss erfolgte die mehrtägige Dezellularisierung nach dem von der Arbeitsgruppe etablierten Protokoll (vgl. Tabelle 1, [98]), die auf der Verwendung von 2 % Natrium-desoxycholsäure-Lösung (NaDC, Roth, Karlsruhe) als Detergens und boviner pankreatischer DNase Roche, Mannheim; LOT 10104159001) als Nuklease basiert. Tag 1 meint dabei den Tag der Präparation. Den letzten Dezellularisierungsschritt stellte die



**Abb. 7: Präparation porziner Konjunktiva.** Der Pfeil zeigt die Präparationsrichtung der bulbären Konjunktiva von peripher nach zentral. Die gestrichelte Linie markiert den Limbusbereich, an dem die mit der Tenonkapsel fest angewachsene Konjunktiva von ihrer Anheftungszone abgetrennt wurde.

Tag	Wiederholungen bzw. Zeitraum	Vorgang
1	3 ×	Waschen von PK mit 4 °C kaltem PBS + 1 % P/S
	über Nacht (ü. N.)	Lagerung in PBS + P/S bei 4 °C auf Schüttler (Orbital mini shaker, VWR, Radnor, USA)
2	3 ×	Waschen mit 4 °C kaltem PBS + P/S
	3 Stunden	Inkubation in 2 % NaDC-Lösung bei 4 °C auf Schüttler
	3 ×	Waschen mit 4 °C kaltem PBS + P/S
	ü. N.	Inkubation in frischer 2 % NaDC-Lösung bei 4 °C auf Schüttler
3	3 ×	Waschen mit 4 °C kaltem PBS + P/S
	3 Stunden	Inkubation in DNase-Lösung (667 U/ml in PBS ohne Zusätze) bei 37 °C auf Schüttler
	3 ×	Waschen mit 4 °C kaltem PBS (ohne Zusätze)
	ü. N.	Inkubation in PBS auf Schüttler
4	3 ×	Waschen mit 4 °C kaltem PBS
	Lagerung	Lagerung bis Gamma-Sterilisation in PBS bei 4 °C

**Tabelle 1: Dezellarisierungsprotokoll für porcine Konjunktiva (PK).** Für die einzelnen Dezellarisierungsschritte wurde jeweils ein Volumen von 5 ml pro Well verwendet. Die Rotationsgeschwindigkeit des Schüttlers betrug für alle Anwendungen 220 rpm (*revolutions per minute*).

Gamma-Sterilisation der PDK (BBF Sterilisationsservice GmbH, Kernen, Deutschland) dar. Die Sterilisation erfolgte mittels Co-60 Gammastrahlung mit einer durchschnittlichen Strahlungsdosis von 31 kGy, wobei die angeforderte Mindeststrahlungsdosis von 25 kGy in keinem Fall unterschritten wurde. Die Zeitspanne bis zum Wiedererhalt der PDK nach Sterilisation betrug in keinem Fall länger als 14 Tage [120].

### 2.1.2 Lagerung von PDK

Für die Lagerung wurden die PDK nach Gamma-Sterilisation in drei Gruppen aufgeteilt, die sich im Hinblick auf die Wahl des Lagerungsmediums und der Lagerungstemperatur unterschieden. Eine Übersicht der drei Lagerungsvarianten ist in Tabelle 2 dargestellt.

Bei der Lagerungsvariante in PBS wurden PDK in Falcons mit 10 ml neu zugegebenem PBS ohne Zusätze bei 4 °C aufbewahrt. Für die EM/Glycerol-Lagerung wurden PDK in ein 1:1 Gemisch aus Glycerol (Glycerol 85 %, sterilisiert, Zentralapotheke Universitätsklinikum Düsseldorf) und Epithelzellmedium (EM, Zusammensetzung s. Tabelle 3) überführt und im Anschluss in einem Volumen von 10 ml bei -80 °C im Ultratiefkühlschrank (Thermo Scientific Forma 900 series, Waltham, USA) tiefgefroren.

Variante	Lagerungsmedium	Temperatur	Zeitraum	
PBS	PBS	+ 4 °C	2 Monate	6 Monate
EM/Glycerol	Glycerol 85 % : EM (1:1)	- 80 °C		
EM/DMSO	EM inkl. 10 % DMSO	Flüssigstickstoff		
Kontrolle	PDK nach kurzzeitiger (max. 96 h) Aufbewahrung in PBS (4 °C) nach Sterilisation			

**Tabelle 2: Darstellung der Lagerungsbedingungen und -zeiträume von porziner dezellularisierter Konjunktiva.** Insgesamt ergeben sich sechs Lagerungsvarianten und eine Kontrollgruppe (PBS = Phosphatgepufferte Salzlösung, DMSO = Dimethylsulfoxid, EM = Epithelzellmedium); Quelle: eigene Tabelle [120].

Die EM/DMSO-Lagerungsvariante entspricht der Lagerung in 80 % EM sowie zusätzlich jeweils 10 % fetalem bovines Serum (s. Tabelle 3) und 10 % DMSO (DMSO für Zellkultur, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) am Gesamtvolumen. Zu den Proben wurden jeweils 1,5 ml dieses Mediums zugegeben, anschließend im Gefrierbehälter (Mr. Frosty, Thermo Scientific, Waltham, USA) mit einer Kühlrate von -1° C/min auf -80 °C gefroren und am nächsten Tag in Flüssigstickstoff überführt.

Substanz	Zusätzliche Angaben	Konzentration im Medium	Hersteller
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham, 1:1 mixture, mit L-Glutamin	Basismedium	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
FBS	Fetales bovines Serum	10 %	Biochrom, Berlin
Antibiotische u. antimykotische Lösung	10.000 E. Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin, 25 µg/ml Amphotericin B	1 %	Sigma-Aldrich
Hydrocortison		0.4 µg/ml	Sigma-Aldrich
Choleratoxin	von Vibrio cholerae	0.1 nM	Sigma-Aldrich
Natriumbikarbonat		0.075 %	Gibco, Waltham, USA
Adenin		0.18 mM	Sigma-Aldrich
T3	3,3',5-Triiodo-L-Thyronin	2 nM	Sigma-Aldrich
Transferrin	human	5 µg/ml	Sigma-Aldrich
Insulin	human	5 µg/ml	Sigma-Aldrich

**Tabelle 3: Zusammensetzung des Epithelzellmediums.**

Für alle nachfolgend beschriebenen Methoden diente nach Sterilisation für maximal 96 h in PBS bei 4 °C aufbewahrte PDK als Kontrolle.

Für die folgenden Untersuchungen wurden die eingefrorenen PDK nach der entsprechenden Lagerung über Nacht bei 4 °C aufgetaut. Vor der weiteren Verwendung wurden alle PDK dreimal in jeweils 5 ml PBS ohne Zusätze gewaschen.

In Anbetracht der Menge benötigter PDK sowie zur Ermöglichung eines zeitversetzten Arbeitens wurden mehrere Präparations-, Dezellularisierungs- und Lagerungszyklen nach oben beschriebenen Schema durchgeführt [120].

## **2.2 Histologie**

Für die histologische Untersuchung wurden PDK von vier verschiedenen Spendern im Vorfeld in jeweils sieben Fragmente (ca. 5 × 5 mm) unterteilt, von denen jedes Fragment einer der sechs Lagerungsgruppen sowie der Kontrollgruppe zugeordnet wurde. Diese Methode diente zur Reduktion der Spendervariabilität.

Zur histologischen Beurteilung wurden PDK für 1,5 Stunden in 4 % Formaldehydlösung (Roti-Histofix, Roth, Karlsruhe) fixiert, danach für fünf Minuten unter laufendem Leitungswasser gewaschen und anschließend mindestens über Nacht und nicht länger als sieben Tage in 70 % Ethanol aufbewahrt.

Die Entwässerung der Proben erfolgte mittels aufsteigender Alkoholreihe im Entwässerungsautomaten (Shandon Citadel 1000, Thermo Scientific, Waltham, USA). Die detaillierte Entwässerungsschritte sind im Anhang Nr. 1 dargestellt. Nach Einbettung in Paraffin (Paraffin Surgipath Paraplast Plus, Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland) in der Ausgießstation (TPS-1 EVO II, Pathisto GmbH, Garbsen, Deutschland) wurden am Mikrotom (Leica RM 2255, Leica, Wetzlar, Deutschland) Serienschnitte mit einer Dicke von 4,5 µm angefertigt. Die Objektträger wurden bei 37 °C über Nacht im Heizschrank (Inkubator Jouan EB 170 SN ELEC, Unterhaching, Deutschland) getrocknet. Anschließend wurden die PDK mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E. Färbung) gefärbt. Das detaillierte Färbeprotokoll ist im Anhang enthalten (Anhang Nr. 2).

Für die histologische Auswertung wurden je PDK drei repräsentative Aufnahmen aus unterschiedlichen Schnitthöhen in  $400 \times$  Vergrößerung beurteilt. Die Faserdichte innerhalb der EZM wurde mittels ImageJ (Version 1.53e, [121]) bestimmt [120].

### **2.3 Transmissionselektronenmikroskopie**

Zur Beurteilung der PDK-Ultrastruktur wurden mit Unterstützung der Core Facility Elektronenmikroskopie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf transmissionselektronenmikroskopische (TEM-) Aufnahmen angefertigt. Hierfür wurde jeweils ein PDK-Fragment (ca.  $2 \times 2$  mm) dreier Spender in vier Teile geteilt, wovon je ein Fragment als Kontrollgewebe beurteilt, die verbleibenden drei Teile hingegen nach einer der drei Lagerungsvarianten (s. Tabelle 2) für einen Zeitraum von sechs Monaten aufbewahrt wurden.

Die Fixierung erfolgte in einem Gemisch aus 4 % PFA (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 2,5 % Glutaraldehyd (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland) in 0,1 M Cacodylatpuffer (aus Natriumcacodylat, Serva Electrophoresis, Heidelberg) für maximal drei Tage bei 4 °C. Zur Entwässerung diente eine aufsteigende Acetonreihe, wobei das Gewebe in einem Zwischenschritt in einem Gemisch aus 1 % Phosphorwolframsäure (Merck, s.o.) und 0,5 % Uranylacetat (Merck, s.o.) in 70 % Aceton kontrastiert wurde. Für die nachfolgende Einbettung wurde reines Spurr (Einbettharz, Serva, s.o.) verwendet, diese wurde im letzten Schritt mittels Polymerisation bei 70 °C im Wärmeschrank (Memmert, Schwabach, Deutschland) durchgeführt. Das detaillierte Protokoll ist im Anhang enthalten (Anhang Nr. 3).

Anschließend wurden am Ultramikrotom Ultracut EM UC7 (Leica, Wetzlar, Deutschland) Ultradünnschnitte von 70 nm Dicke erstellt und mit Chloroform (Merck, s.o.) gestreckt. Die Schnitte wurden dann auf Grids (SP159, Plano, Wetzlar) aufgenommen. Die Nachkontrastierung der Schnitte wurde zunächst mit 1,5 %-iger wässriger Uranylacetatlösung, danach mit Bleicitratlösung (nach Reynolds, 1963) durchgeführt. Die Aufnahmen erfolgten mit dem Transmissionselektronenmikroskop Hitachi H7100 (Hitachi, Tokio, Japan) mit einer Morada Kamera (EMSIS GmbH, Münster, Germany) bei einer Beschleunigungsspannung von 100 kV. Es wurden von jeder Probe stichprobenartig alle Quadranten von ein bis zwei Grids aus zentralen Bereichen beurteilt (ca. 20 Aufnahmen je PDK) [120].

## 2.4 Quantifizierung von Proteinen der EZM

### 2.4.1 Bestimmung des Kollagengehalts

Zur Bestimmung des Kollagengehaltes wurde der Sircol Insoluble Collagen Assay 2000 der Firma biocolor (Carrickfergus, Nordirland, UK) verwendet. Dieser Assay ermöglicht es, quervernetztes und unlösliches Kollagen (Typ I, II, III, V und XI) ohne den Einsatz von starken Säuren und hohen Temperaturen zu denaturieren und zu quantifizieren. Er basiert auf der Verwendung eines Farbstoffes, der an die Tripeptidsequenz quervernetzter Kollagenketten bindet und somit je nach Kollagengehalt der Probe die Messung unterschiedlicher Absorptionswerte ermöglicht. Als Standard wurde die enthaltene Referenzlösung (bovines Kollagen, 1 mg/ml) verwendet.

Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde je Probe anstelle von 20-30 mg Nassgewicht das Trockengewicht verwendet, um artifizielle Gewichtsunterschiede durch verschiedene Quellungszustände der PDK zu minimieren. Die für den Assay verwendeten PDK wurden deshalb im Vorfeld für 90 min bei 30 °C in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator plus/Vacufuge plus, Eppendorf, Hamburg) getrocknet und danach auf 6,2 ( $\pm 0,2$ ) mg zugeschnitten. Das Gewicht wurde mit einer Feinwaage (ABJ 220-4NM, Kern & Sohn, Balingen, Deutschland) ermittelt. Zur anfänglichen Fragmentierung der Kollagenanteile der PDK bei 65 °C in einem Thermoshaker (PCMT Thermoshaker, Grant Instruments, Shepreth, UK ) wurden 200  $\mu$ l *Fragmentation Reagent* pro mg Trockengewicht eingesetzt.

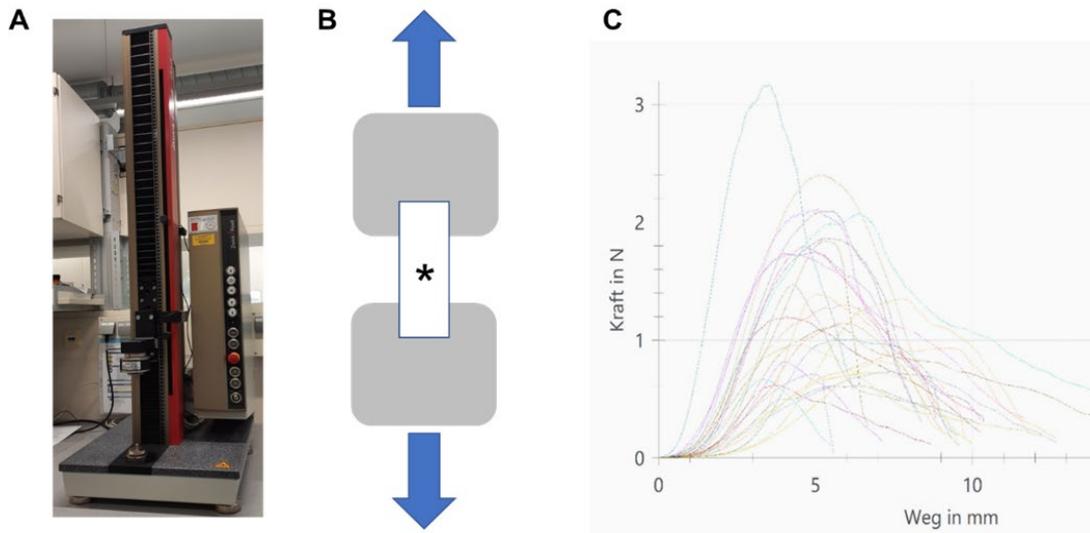
Die weiteren Schritte erfolgten gemäß Herstellerprotokoll: Diese waren eine Verdünnung (Zugabe von 20  $\mu$ l der Fragmentationslösung zu destilliertem Wasser), eine Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge Typ 5425, Eppendorf, Hamburg) sowie die nachfolgende Anfärbung des kollagenhaltigen Zentrifugats mittels im Testkit enthaltenen *Dye Reagent (Sirius Red)*. Das Zentrifugat wurde anschließend nach einem weiteren Wasch- und Zentrifugationsschritt in Natriumhydroxidlösung (0,5 M) aufgelöst. Die Absorptionsmessung wurde photometrisch mittels Plattenlesegerät (VICTOR X4 Plate Reader, PerkinElmer, Waltham, USA) bei 531 nm durchgeführt. Für die Kollagenquantifizierung wurde in allen Gruppen mit n = 10 gearbeitet [120].

## 2.4.2 Bestimmung des Elastingehalts

Der Elastingehalt wurde mittels eines Elastinassays (Fastin Elastin Assay, biocolor, Carrickfergus, Nordirland, UK) bestimmt. Auch hier wurde mit Trockengewicht (zwischen 4,8 – 5,4 mg pro PDK) gearbeitet. Die Durchführung des Assays erfolgte gemäß Herstellerprotokoll: Für die mehrschrittige Elastinextraktion erfolgte die Erhitzung der Proben für eine Stunde in 750  $\mu$ l Oxalsäure (0,25 M) bei 100 °C, um eine Umwandlung des hydrophoben Elastins in wasserlösliches  $\alpha$ -Elastin zu ermöglichen. Der Extraktionsschritt wurde mit demselben PDK-Fragment jeweils dreimal durchgeführt. Aus allen Extraktionsflüssigkeiten wurde für die weiteren Schritte jeweils ein Arbeitsvolumen von 100  $\mu$ l verwendet, zu dem im nächsten Schritt das *Precipitation Agent* des Testkits hinzugegeben wurde. Auf die anschließende Zentrifugation folgte nach Entfernung des Überstandes die Anfärbung des Zentrifugats mittels *Dye Reagent* (5,10,15,20-Tetraphenyl-21H,23H-Porphyrin) und eine erneute Zentrifugation. Nach einem Waschschrift wurden jeweils 250  $\mu$ l des *Dye Dissociation Reagent* des Herstellers hinzugegeben und die vollen Volumina anschließend in eine 96-Well-Platte überführt. Die Absorptionsmessungen der Lösungen wurden an einem Plattenlesegerät (SPARK, Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 520 nm durchgeführt. Als Standard wurde im Testkit enthaltenes bovines Elastin (1 mg/ml) verwendet und ermöglichte die Berechnung des Elastingehalts der einzelnen Extrakte. Letztere wurden anschließend zum insgesamt extrahierten Elastinwert pro PDK-Fragment addiert. Die Stichprobengröße betrug  $n = 6$  [120].

## 2.5 Evaluation der Biomechanik

Die biomechanischen Messungen wurden mit einer Materialprüfmaschine (Typ 500N zwicki, Zwick/Roell, Ulm) für Zugversuche durchgeführt (Abb. 8). Hierfür wurden Fragmente der PDK von definierter Fläche (10  $\times$  5 mm) in der Probenhalterung des Geräts eingespannt und in vertikaler Richtung bis zum Riss auseinandergezogen. Für den Zugschnitt wurden die PDK auf eine Nitrozellulosemembran (Whatman Protran BA 85, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) aufgespannt, die innerhalb der Probenhalterung unmittelbar vor dem Zugversuch wieder vorsichtig durchtrennt wurde. Die Materialtestung erfolgte ab einer Vorkraft von 0,001 N und bei einer Testgeschwindigkeit von zunächst 5 mm/min zur Ermittlung des Elastizitätsmoduls (E-Moduls), für die weiteren Parameter



**Abb. 8: Schema des Zugversuchs.** A) Materialprüfmaschine, B) Schemazeichnung der Probenhalterung im Blick von vorne mit zentral eingespannter porziner dezellularisierter Konjunktiva (\*) und Messung bei axialem Zug, C) exemplarische Kraft-Dehnungskurven.

anschließend mit einer Geschwindigkeit von 25 mm/min. Mittels zugehöriger Software (testXpert® III - V1.5, Zwick/Roell, Ulm) wurden neben dem E-Modul auch die Zugfestigkeit und die Bruchdehnung als relative Gesamtdehnung zum Ausgangswert berechnet. Die Elastizität des Gewebes wird mit dem Elastizitätsmodul in der Einheit einer mechanischen Spannung (Pa = Pascal) beschrieben. Je höher der Wert des E-Moduls, umso mehr Widerstand setzt das Gewebe seiner Verformung entgegen. Somit stehen niedrigere Werte für eine höhere Elastizität und umgekehrt. Bei der Zugfestigkeit handelt es sich um die maximale auf die Oberfläche der Testprobe bezogene Zugkraft, die vor dem Zerreißen erreicht wird. Sie ist ein Indikator für die Festigkeit des Materials und wird ebenfalls als mechanische Spannung angegeben. Als Maß für das Dehnungsverhalten der PDK diente die Gesamtdehnung bei Bruch. Letztere wurde als prozentuale Verlängerung im Verhältnis zur Ausgangslänge bestimmt. Die Stichprobengröße betrug  $n = 9$  [120].

## 2.6 Reepithelialisierung der PDK

### 2.6.1 Gewinnung von HCEC für die Rezellularisierung

HCEC wurden mittels Explantkultur aus humanen Konjunktiven gewonnen, die von der Lions-Hornhautbank der Universitätsklinik Düsseldorf zur Verfügung gestellt wurden

Spender	Geschlecht	Lebensalter zum Todeszeitpunkt (Jahre)	Lagerungszeitraum bis zur Verwendung (d)	Kultivierungsdauer vor Kryokonservierung (d)
1	männlich	75	9	12
2	weiblich	88	8	11
3	männlich	76	11	12

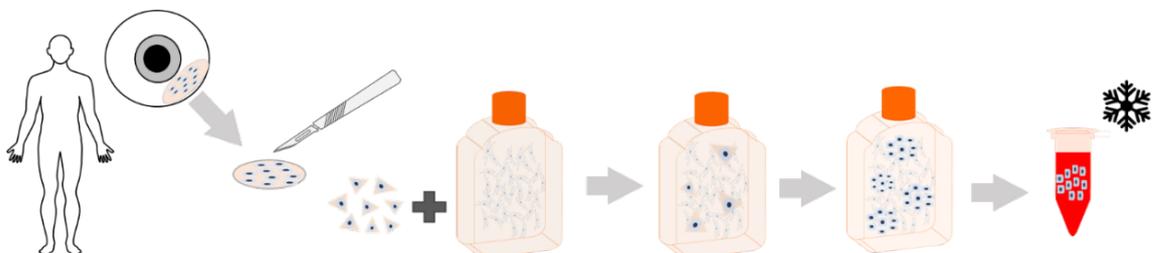
**Tabelle 4: Übersicht zu Spender- und Kultivierungsdaten zur Gewinnung humaner konjunktivaler Epithelzellen für die Rezellularisierung gelagerter porziner dezellularisierter Konjunktiva.**

(bzgl. Ethikvotum siehe Abschnitt 3.8). Es wurden Biopsate von drei Spendern verwendet (s. Tabelle 4).

Zur Kultivierung von HCEC wurden die Spenderkonjunktiven unter einer Sterilbank (Typ S2020 1.2 Klasse II, Thermo Scientific, Waltham, USA) in kleinere Fragmente zerteilt. Diese wurden auf einer Schicht aus Mitomycin C (MMC)-behandelten und damit wachstumsarretierten 3T3-Fibroblasten als „*feeder cells*“ (dt.: Fütterzellen) mit einer Zelldichte von 1,8 Millionen Zellen pro T75-Zellkulturflasche ausgestreut (s. Abb. 9).

Die Behandlung mit MMC (MMC von *Streptomyces caespitosus*, Sigma-Aldrich) war im Vorfeld für zwei Stunden mit einer Endkonzentration von 4 µl/ml Zellmedium durchgeführt worden. Die Kultivierungsmethode von HCEC auf einem *feederlayer* stellt in unserer Arbeitsgruppe und darüber hinaus eine etablierte Methode dar. Die vielfältigen Funktionen der *feeder cells* werden in einem Review von Llames et al. beschrieben [122].

Nach dem Anwachsen der konjunktivalen Fragmente an den Flaschenboden innerhalb von ca. drei Tagen wurde alle zwei Tage ein Mediumwechsel mit EM unter Zusatz von hEGF (*Recombinant Human Epidermal Growth Factor*, PHG0313, Gibco) in einer Endkonzentration von 10 ng/ml Medium durchgeführt und die Explantkultur bis zur



**Abb. 9: Kultivierung primärer humaner konjunktivaler Epithelzellen für die Rezellularisierung gelagerter porziner dezellularisierter Konjunktiva.** Anwachsen von Fragmenten humaner Spenderkonjunktiven auf einem *feederlayer* aus wachstumsarretierten 3T3-Fibroblasten, nachfolgende Trypsinierung der Epithelzellkolonien nach 11-12 Tagen und Kryokonservierung in Flüssigstickstoff.

Ausbildung von makroskopisch sichtbaren Epithelkolonien fortgesetzt. Nach Tag 12 bei Spender 1 und Spender 3 sowie Tag 11 bei Spender 2 wurden die Epithelkolonien vom Flaschenboden abgelöst, indem zunächst die *feeder cells* mit  $1 \times$  Trypsin (Trypsin-EDTA-Lösung, Sigma-Aldrich) abgelöst und darauffolgend die HCEC mit  $10 \times$  Trypsin (Trypsin-EDTA-Lösung, Sigma-Aldrich) abgetrennt wurden.

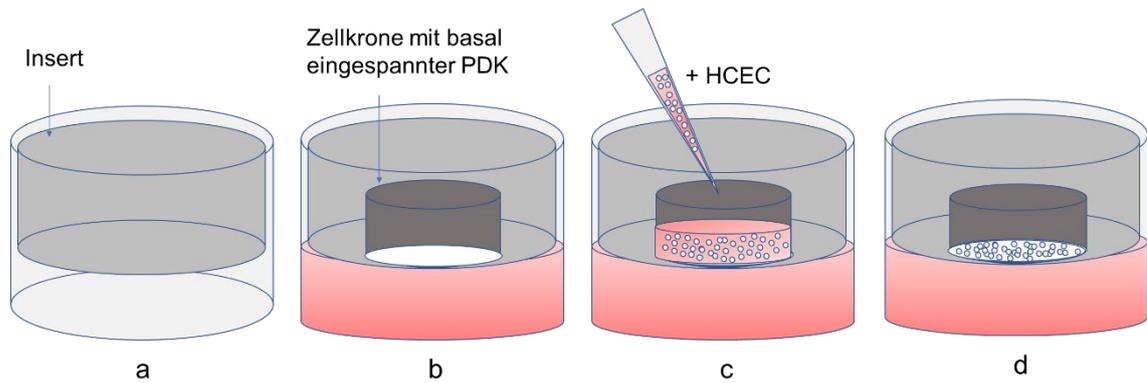
Für die Kryokonservierung wurden die HCEC in einer Konzentration von 1 Millionen HCEC/ml Kryomedium bestehend aus EM (80 %), FBS (10 %) und DMSO (10 %) in Kryobehälter überführt. Diese wurden anschließend im Gefrierbehälter (Mr. Frosty, Thermo Scientific, Waltham, USA) mit einer Kühlrate von  $-1 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  auf  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gefroren und ab dem folgenden Tag in Flüssigstickstoff kryokonserviert.

Die Revitalisierung und Kultivierung der HCEC für die Rezellularisierung der PDK erfolgte ebenfalls auf einem *feederlayer*. Statt konjunktiver Fragmente wurden nun kryokonservierte und revitalisierte HCEC verwendet und dafür kurzzeitig in einem Wasserbad bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  aufgetaut. Nach Überführung der HCEC ins aufgewärmte Zellkulturmedium und Zentrifugation bei Raumtemperatur mit  $500 \times g$  (Heraeus Megafuge 16, Thermo Scientific, Waltham, USA) wurden die HCEC resuspendiert in einer Menge von 500.000 Zellen pro T75-Zellkulturflasche zum *feederlayer* hinzugegeben. Nach der Adhäsion der HCEC an den Flaschenboden erfolgte der Mediumwechsel nach zuvor genanntem Schema im Abstand von zwei Tagen. Die Rekultivierungsdauer betrug für die Spender 1 und 3 acht Tage, für Spender 2 sieben Tage. Die Trypsinierung der HCEC entsprach der Vorgehensweise bei der Isolation der HCEC.

### **2.6.2 Rezellularisierung der PDK mit HCEC**

Für die Rezellularisierung der PDK wurde aufgrund geringer Zellausbeute nach Kultivierung und der Notwendigkeit zeitversetzten Arbeitens auf HCEC von drei verschiedenen Spendern zurückgegriffen. Nähere Spenderinformationen in Bezug auf die verwendeten HCEC sind in Tabelle 4 angegeben. Eine Differenzierung der rezellularisierten PDK nach Spender-HCEC findet sich in Tabelle 5.

Für die Rezellularisierung mit HCEC wurden PDK mit Ausrichtung der ursprünglichen Epithelseite nach oben in Zellkronen (cellcrown24, Scaffdex, Tampere, Finnland) mit einem Durchmesser von 8,5 mm eingespannt, in ein Insert für 6-Well-Platten (Porengröße  $3 \text{ } \mu\text{m}$ , Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gestellt und in den Wells befestigt (Abb. 10).



**Abb. 10: Rezellularisierungstechnik gelagerter porziner dezellularisierter Konjunktiva (PDK).** a) 6-Well mit Insert, b) dem Insert aufliegende Zellkrone mit eingespannter PDK, c) Zugabe von 400.000 primärer humaner konjunktivaler Epithelzellen (HCEC) je PDK (400  $\mu$ l) und Epithelzellmedium + EGF ober- und unterhalb des Inserts, d) air-liquid-interface.

Die Auflage der PDK auf ein Insert ermöglichte ein höheres basales Mediumvolumen im Vergleich zu einer 24-Well-Platte. Durch Zugabe von 400  $\mu$ l EM ohne EGF-Zusatz von apikal auf die PDK und den basalen Kontakt zum EM (4,6 ml) wurden die PDK im Inkubator (Heracell 240i, Thermo Scientific, Waltham, USA) über Nacht äquilibriert. Am Folgetag wurde das EM abgesaugt. Daraufhin wurden revitalisierte HCEC in 400 $\mu$ l Zellsuspension entsprechend einer Anzahl von 400.000 Zellen je Zellkrone auf die PDK sowie von basal weitere 4,6 ml EM als Nährmedium hinzugegeben. Das EM enthielt wie bei Kultivierung der HCEC hEGF in einer Endkonzentration von 10 ng/ml Medium. Unter zweitägigem Mediumwechsel und Lagerung im Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurden die HCEC über 14 Tage auf den PDK kultiviert, ab Tag 8 in einer *air-liquid-interface*,

		Anzahl spenderabhängig rezellularisierter PDK nach Lagerungsmethode			
		Kontrolle	PBS	EM/Glycerol	EM/DMSO
	Kultivierungsdauer nach Revitalisierung (d)				
Spender 1	8	2	-	2	2
Spender 2	7	1	2	2	2
Spender 3	8	1	2	-	-
<b>insgesamt</b>		<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>

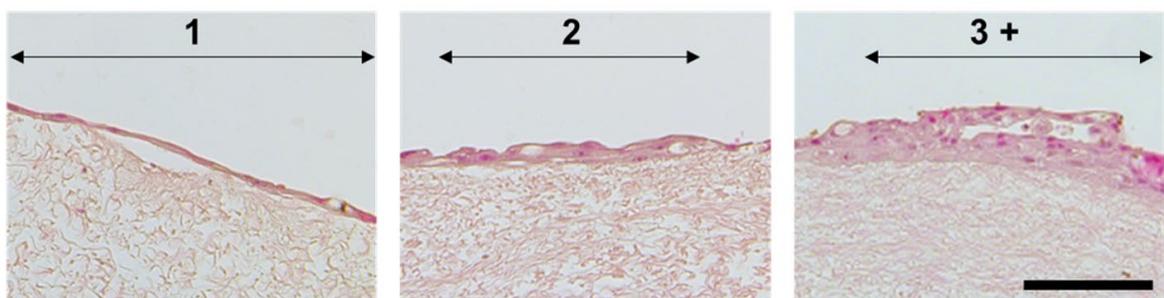
**Tabelle 5: Spenderaufteilung bei Rezellularisierung gelagerter porziner dezellularisierter Konjunktiva.** Es wurden primäre HCEC dreier Spender verwendet.

d.h. alleiniger Mediumzugabe von basal und mit einer reduzierten EGF-Endkonzentration von 0.5 ng/ml EM. An Tag 14 wurden die PDK ausgestanzt (8 mm Stanze, pfmmmedical, Köln), in Einbettkassetten für fünf Minuten unter laufendem Leitungswasser gewaschen und anschließend mindestens über Nacht und nicht länger als sieben Tage in 70 % Ethanol aufbewahrt. Die histologische Aufarbeitung erfolgte nach dem bereits in Abschnitt 2.2. beschriebenen Schema. Insgesamt wurden 16 PDK untersucht (n = 4) [120].

### 2.6.3 Histologische Auswertung rezellularisierter PDK

Für die Evaluation der Reepithelialisierung wurden je PDK zwei zentrale und zwei periphere Schnitte ausgewertet. Hierfür wurden je Schnitt aus mehreren Einzelaufnahmen in 200 × Vergrößerung zusammengesetzte lichtmikroskopische Aufnahmen (Software Leica Application Suite Version 4.6.1, Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland) erstellt. Eine exemplarische zusammengesetzte Aufnahme eines rezellularisierten PDK-Abschnitts ist im Anhang enthalten (Anhang Nr. 4).

Mittels ImageJ (Version 1.53e, [121]) wurde auf vier solcher Aufnahmen je PDK der Anteil der epithelialisierten Oberfläche an der Gesamtlänge der Schnitte vermessen und wird im Ergebnisteil als „Epithelialisierungswert“ bezeichnet. Zudem wurde der jeweilige Anteil des ein-, zwei- und drei- bzw. mehrschichtigen Epithels an dem Gesamtepithel bestimmt (vgl. Abb. 11) [120]. Durchschnittlich wurden  $119,60 \pm 5,98$  mm Schnittlänge pro PDK ausgewertet.



**Abb. 11: Repräsentative Aufnahmen von sechsmonatig gelagerter porziner dezellularisierter Konjunktiva nach Rebesiedelung mit primären humanen konjunktivalen Epithelzellen.** Beispiele für ein- (links), zwei- (mittig) und drei- bzw. mehrschichtiges Epithel (rechts); 200 × Vergrößerung, Maßstab = 100 µm; Quelle: modifizierte eigene Abbildung [120].

## **2.7 Statistik**

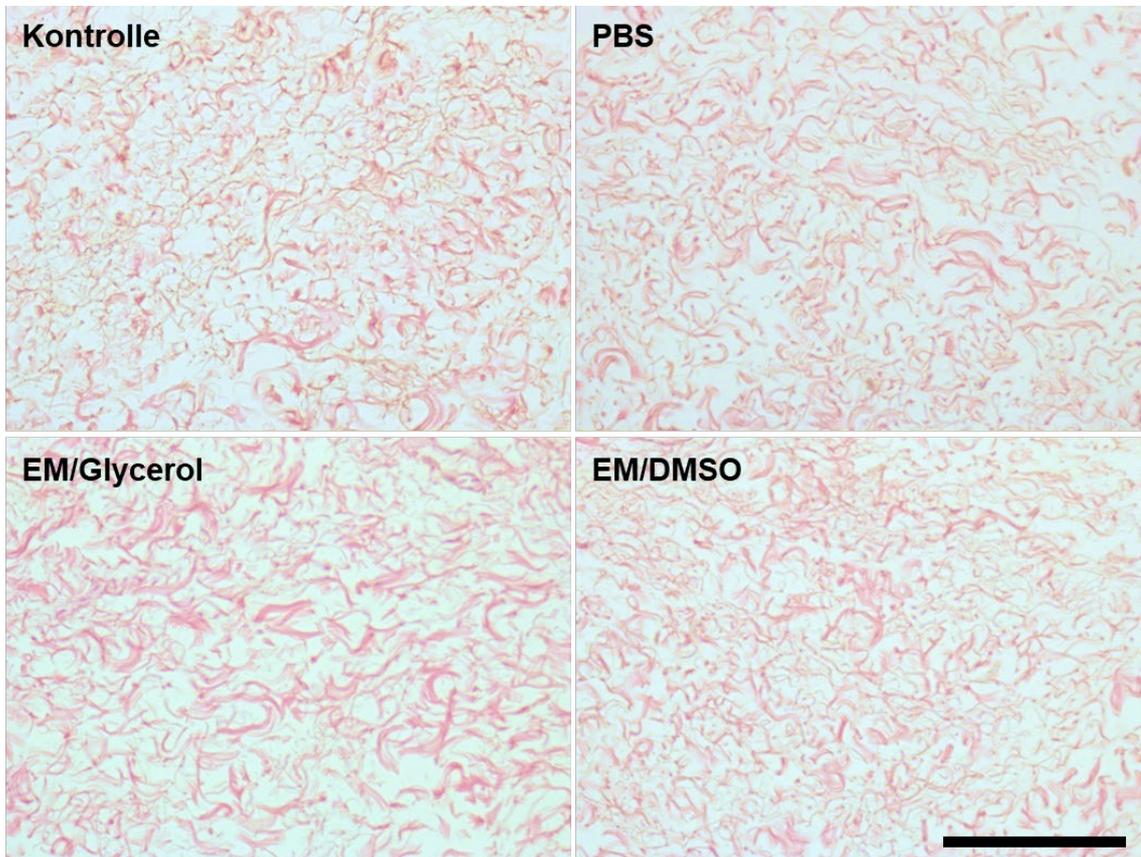
Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism Version 9.3.1 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Als statistisches Testverfahren wurde bis auf eine Ausnahme die mehrfaktorielle Varianzanalyse (*two-way-ANOVA*) mit dem Tukey-Test verwendet. Für die Auswertung der Reepithelialisierungskapazität wurde als nicht-parametrisches Testverfahren der Kruskal-Wallis-Test gewählt, da es sich hier um einen unifaktoriellen Datensatz handelte. Alle Werte sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Das Signifikanzlevel wurde auf 5 % gesetzt.

## **2.8 Ethikvotum**

Für die Durchführung dieser Studie lag ein gültiges Ethikvotum der Ethikkommission an der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vor (Studennummer 4139).

### 3. Ergebnisse

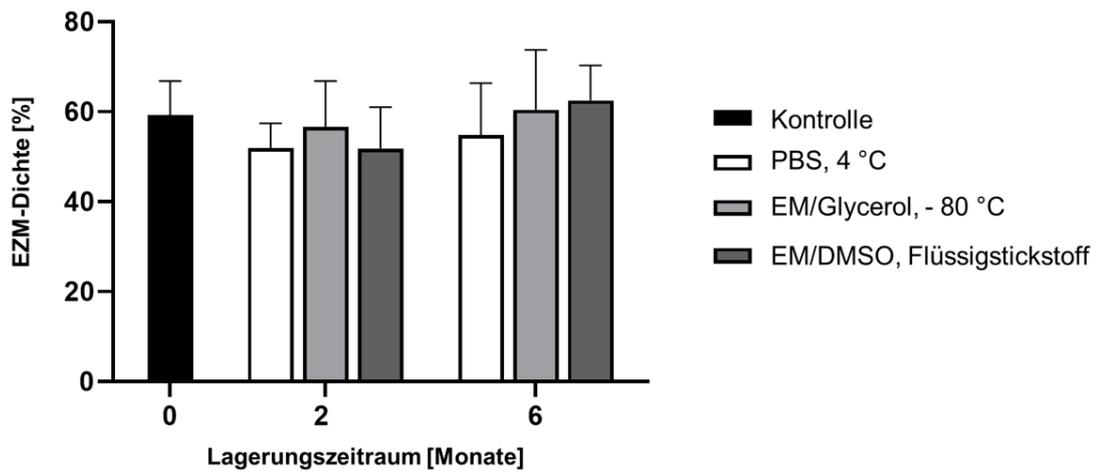
#### 3.1 Strukturergalt der Extrazellulärmatrux



**Abb. 12: Repräsentative Aufnahmen porziner dezellularisierter Konjunktiva nach sechsmonatiger Lagerung in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), Epithelzellmedium/Glycerol (EM/Glycerol) und Epithelzellmedium/Dimethylsulfoxid (EM/DMSO). Es zeigt sich eine erhaltene EZM-Struktur ohne sichtbare Auflockerung und EZM-Brüche; 400 × Vergrößerung, Messbalken = 100 µm; Quelle: modifizierte eigene Abbildung [120].**

Die histologische Auswertung der PDK zeigte eine erhaltene EZM-Architektur mit vernetzten Kollagenbündeln in allen Gruppen (s. Abb. 12). Auflockerungen oder Brüche der EZM waren nicht zu beobachten.

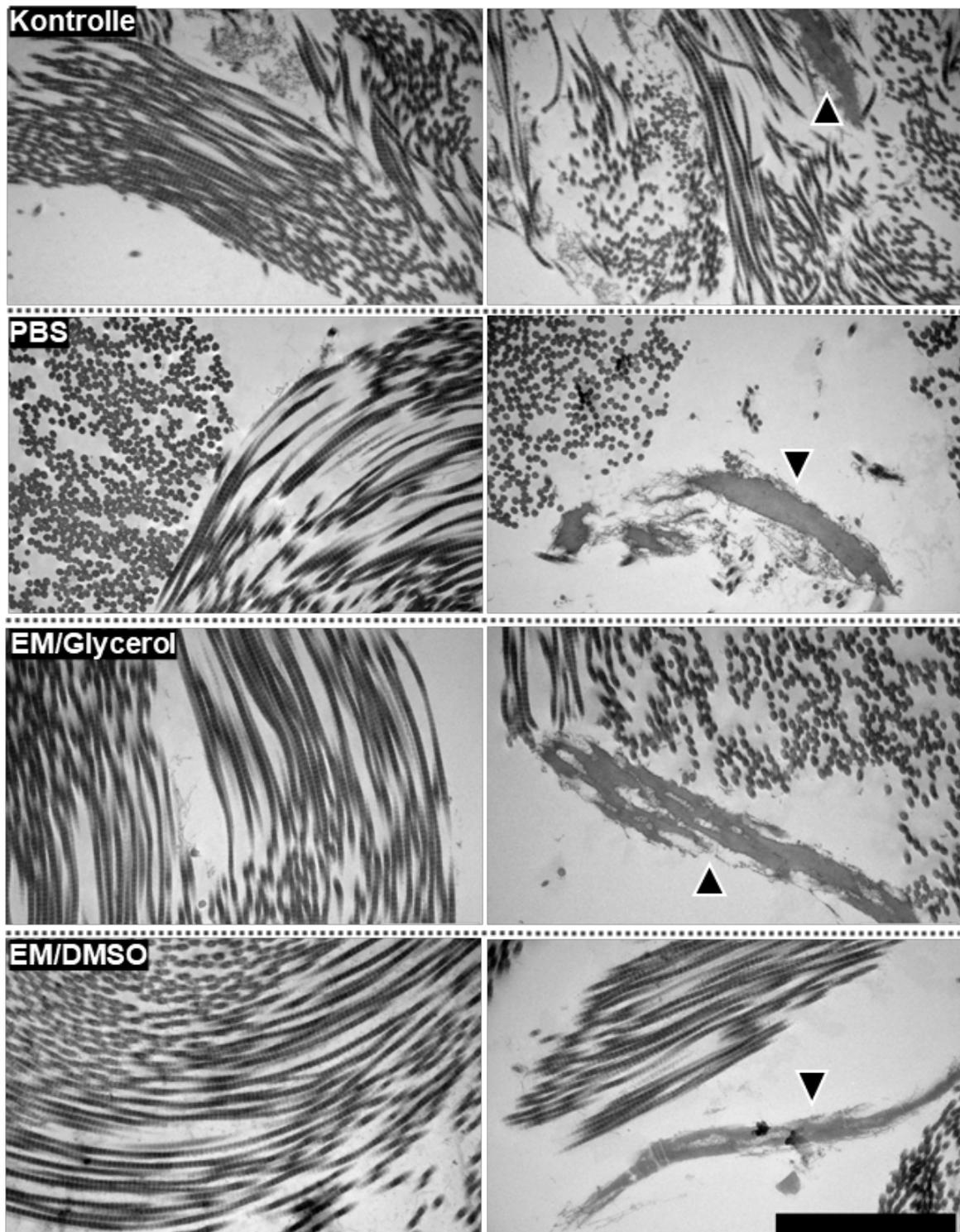
Die Bestimmung des Anteils aller Faserstrukturen am Gesamtbild (= EZM-Dichte) mittels ImageJ ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlich gelagerten PDK ( $p \geq .74$ , Abb. 13) [120].



**Abb. 13: Dichte der Extrazellulärmatrix (EZM) gelagerter porziner dezellularisierter Konjunktiva.** Nach Lagerung in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), Epithelzellmedium/Glycerol (EM/Glycerol) und Epithelzellmedium/Dimethylsulfoxid (EM/DMSO) für jeweils zwei und sechs Monate zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ( $p \geq .74$ ;  $n = 4$ ); Quelle: modifizierte eigene Abbildung [120].

Die Auswertung der transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen ergab für alle Lagerungsvarianten intakte Kollagenfasern mit gleichmäßigen Abständen zwischen den Faserbündeln. Unterbrechungen der Bündelstrukturen oder deutliche Änderungen des Bündelverlaufs waren nicht zu beobachten. Auch bezüglich der Morphologie der Kollagenfasern, d.h. der Faserbegrenzung, der Faserdicke und der Querstreifung zeigten sich sowohl im Längs- als auch im Querschnitt (Abb. 14) keine Unterschiede zwischen den PDK [120].

Neben dem Kollagen ließen sich in allen Gruppen vereinzelt auch Elastinfasern darstellen (Abb. 14, Pfeilspitzen), die verglichen mit ersteren als kürzere, breitere Strukturen imponierten [120]. Deutliche Unterschiede des Elastinvorkommens waren nicht zu beobachten. In Bezug auf die Fasermorphologie zeigten sich sowohl in der Kontrolle als auch in den sechsmonatig gelagerten PDK eine Randunschärfe innerhalb der Faserbegrenzungen sowie stellenweise Dichteminderungen innerhalb der Elastinstrukturen [120].



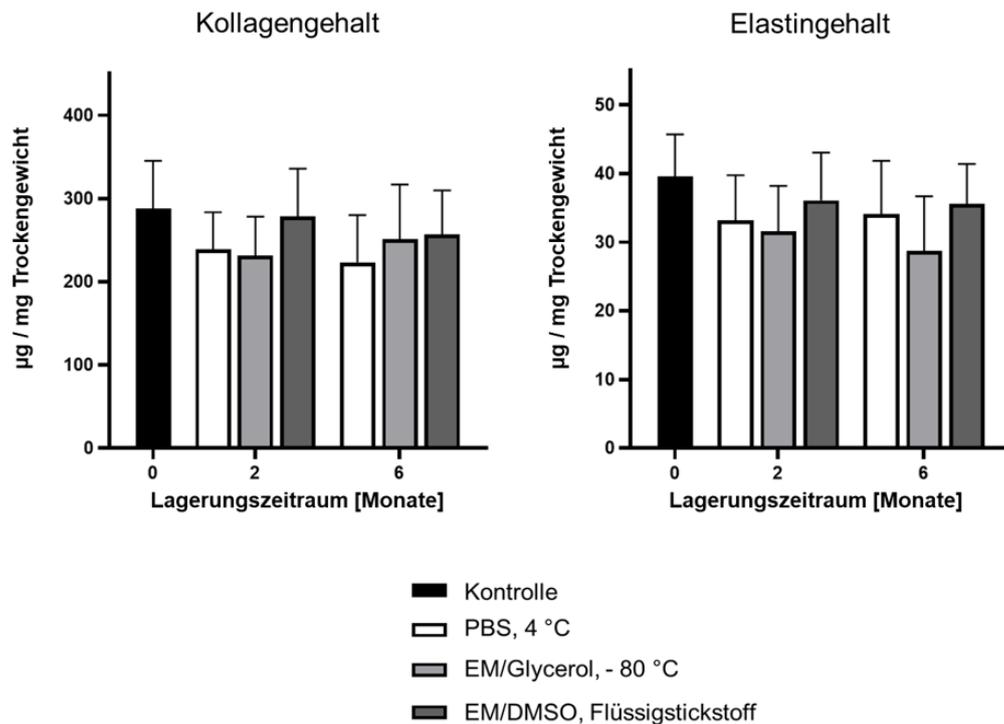
**Abb. 14: Repräsentative transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen unterschiedlich gelagerter porziner dezellularisierter Konjunktiva nach sechs Monaten.** Die linke Spalte zeigt Kollagenfasern im Längs- und Querschnitt, in der rechten Spalte sind Aufnahmen mit Elastinfasern (Pfeilspitzen) dargestellt; 30.000 × Vergrößerung, Maßstab = 2 µm; n = 3; Quelle: modifizierte eigene Abbildung [120].

### 3.2 Erhalt der EZM-Proteine

Die Proteinquantifizierung ergab weder im Kollagen- noch im Elastingehalt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Kollagen:  $p \geq .18$ ; Elastin  $p \geq .13$ ) [120].

Bei Betrachtung der Mittelwerte zeigten sich im Hinblick auf den Kollagengehalt (Abb. 15) der geringste Wert nach sechsmonatiger PBS-Lagerung und die beiden höchsten Werte bei PDK nach Kryokonservierung in EM/DMSO für zwei und sechs Monate.

Innerhalb der Elastinmessungen ergaben sich die höchsten Mittelwerte bei PDK nach Kryokonservierung in EM/DMSO und die niedrigsten nach Lagerung in EM/Glycerol. Den niedrigsten Elastinwert zeigten PDK der EM/Glycerol-Gruppe nach sechs Monaten ( $28,73 \pm 7,27$  vs.  $39,55 \pm 5,62$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  in der Kontrollgruppe).



**Abb. 15: Kollagen- und Elastingehalt von unterschiedlich gelagerten PDK nach jeweils zwei und sechs Monaten.** Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Kollagen:  $p \geq .18$ , Elastin  $p \geq .13$ ); Kollagen:  $n = 10$ , Elastin  $n = 6$ ; Quelle: modifizierte eigene Abbildung [120].

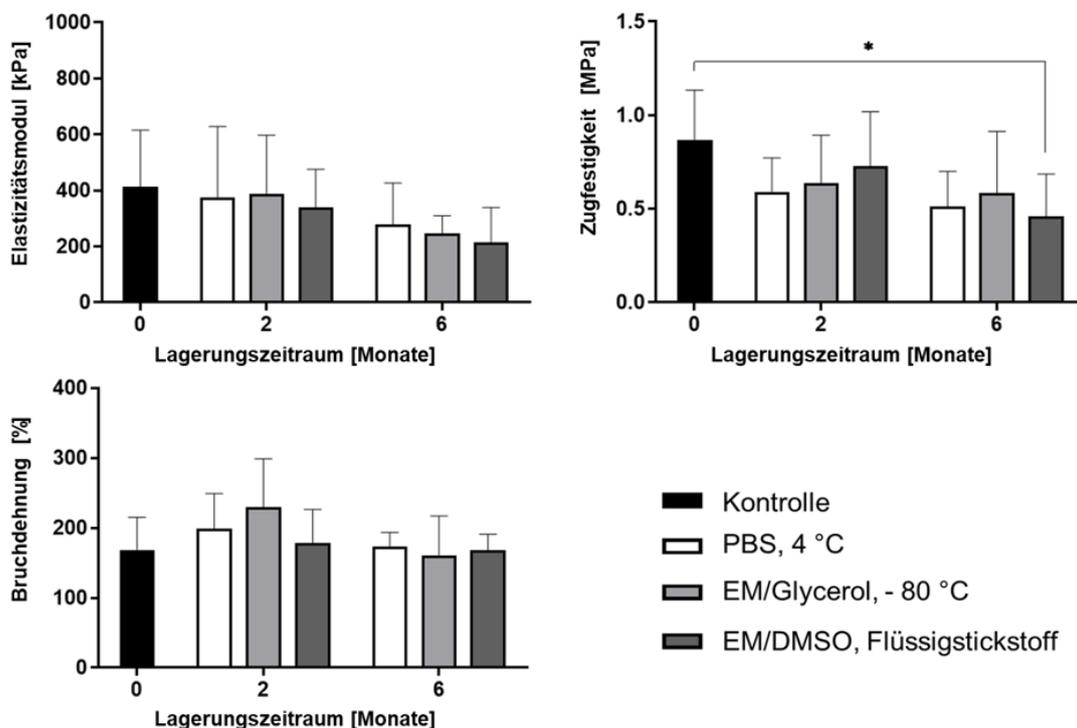
### 3.3 Biomechanik

Die im Zugversuch ermittelten Werte für die Elastizität, die mechanische Belastbarkeit und die Verformungsfähigkeit der PDK sind in Abb. 16 dargestellt.

Bei der Durchführung der Zugversuche konnten in Bezug auf die Handhabung der PDK subjektiv keine Unterschiede zwischen den PDK der verschiedenen Gruppen festgestellt werden. Beim Aufspannen auf die Trägerfolie erwiesen sich alle PDK als dehnbar und reißfest.

Die Auswertung des E-Moduls ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Lagerungsgruppen ( $p \geq .26$ ) [120]. Es fiel auf, dass bei PDK nach sechsmonatiger Lagerung die Mittelwerte aller drei Gruppen im Vergleich zu den PDK nach zwei-monatiger Lagerung und der Kontrollgruppe reduziert waren (Kontrolle:  $414.14 \pm 189.64$  kPa; nach zwei Monaten PBS:  $376.49 \pm 237.18$  kPa, EM/Glycerol:  $389.18 \pm 196.39$ , EM/DMSO:  $340.74 \pm 127.32$  kPa; nach sechs Monaten PBS  $277.93 \pm 140.32$  kPa, EM/Glycerol:  $247.17 \pm 59.09$  kPa, EM/DMSO  $215.12 \pm 116.99$  kPa).

Auch die Mittelwerte der Zugfestigkeit von PDK nach sechsmonatiger Lagerung waren niedriger als jene der kürzer gelagerten PDK (nach zwei Monaten PBS:  $0.59 \pm 0.17$  MPa, EM/Glycerol:  $0.63 \pm 0.24$  MPa, EM/DMSO:  $0.73 \pm 0.27$  MPa; nach sechs Monaten PBS  $0.51 \pm 0.18$  MPa, EM/Glycerol:  $0.58 \pm 0.31$  MPa, EM/DMSO:  $0.46 \pm 0.21$  MPa). Die



**Abb. 16: Biomechanische Eigenschaften unterschiedlich gelagerter porziner dezellularisierter Konjunktiva nach jeweils zwei- und sechsmonatiger Lagerung.** Während das Elastizitätsmodul ( $p \geq .26$ ) und die Bruchdehnung ( $p \geq .06$ ) keine signifikanten Unterschiede aufwiesen, zeigte sich in Bezug auf die Zugfestigkeit eine signifikante Reduktion zwischen der EM/DMSO-Gruppe nach sechs Monaten und der Kontrollgruppe ( $p = .02$ ;  $n = 9$ ); Quelle: modifizierte eigene Abbildung [120].

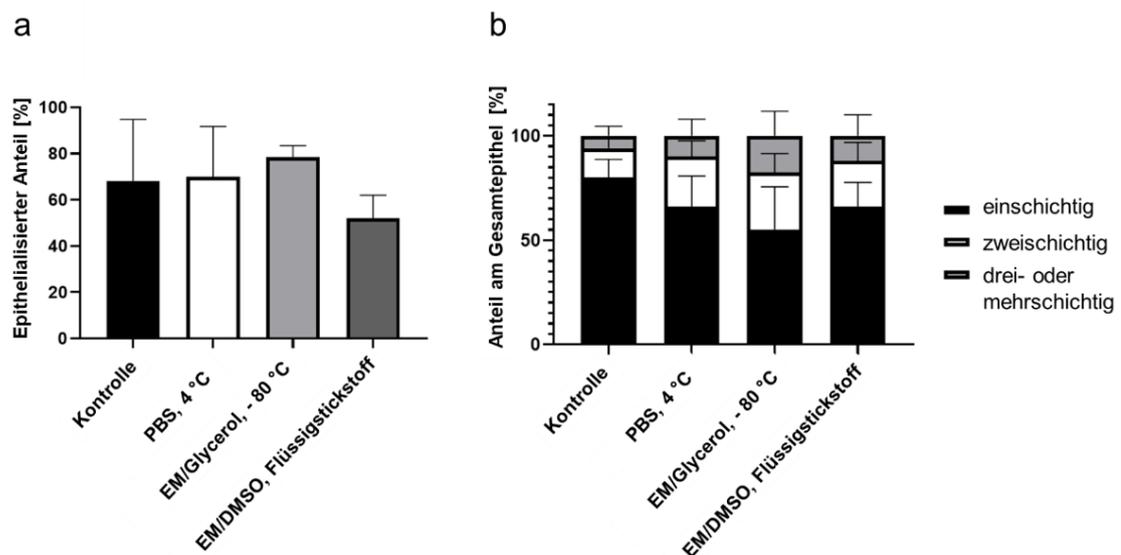
EM/DMSO-Gruppe nach dem sechsmonatigen Lagerungszeitraum zeigte als einzige Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion der Zugfestigkeit ( $0.46 \pm 0.21$  MPa vs.  $0.87 \pm 0.25$  MPa,  $p = .02$ , alle übrigen  $p \geq .08$ ) [120].

Das Dehnungsverhalten der PDK ähnelte sich in allen Gruppen. Die größte, aber nicht signifikante Differenz bestand zwischen den zweimonatig ( $229,44 \pm 65,29$  %) und sechsmonatig ( $160,84 \pm 52,81$  %) in EM/Glycerol gelagerten PDK ( $p = .06$ ) [120].

### 3.4 Reepithelialisierung der PDK

Für die Evaluation der Reepithelialisierung wurde der epithelialisierte Anteil der Oberfläche an der Gesamtlänge der ausgewerteten PDK-Schnitte bestimmt („Epithelialisierungswert“). Die Auswertung der Epithelialisierungswerte gelagerter PDK ist in Abb. 17 dargestellt. Dabei zeigt Abbildungsteil (a) die Epithelialisierung allgemein an, während (b) eine Unterteilung des Gesamtepithels (= 100%) in ein-, zwei- und drei- bzw. mehrschichtiges Epithel vornimmt.

Nach einer Kultivierungsdauer von 14 Tagen zeigten sich auf den PDK aller Lagerungsvarianten adhärente und über längere Strecken der PDK kontinuierliche Epithelien [120]. Statistisch waren zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede der



**Abb. 17: Rezellularisierungskapazität unterschiedlich gelagerter porziner dezellularisierter Konjunktiva (PDK) nach sechsmonatigem Lagerungszeitraum mit primären HCEC.** (a) stellt den epithelialisierten Anteil der Oberfläche an der Gesamtlänge der ausgewerteten PDK dar, (b) zeigt eine Unterteilung des vorhandenen Epithels in ein-, zwei- und drei- bzw. mehrschichtiges Epithel;  $n = 4$ ; Quelle: modifizierte eigene Abbildung [120].

Rezellularisierungskapazität feststellbar ( $p \geq .35$ ) [120]. Die einzelnen Epithelialisierungswerte umfassten einen Bereich zwischen minimal 38,5 % in der EM/DMSO-Gruppe und maximal 92,7 % in der Kontrollgruppe. Die gemittelten Epithelialisierungswerte lagen in einem Bereich zwischen 51,9 % in der EM/DMSO-Gruppe und 78,3 % in der EM/Glycerol-Gruppe. Dabei zeigten die Kontroll- und PBS-Gruppe eine größere Datenstreuung als die EM/Glycerol- und EM/DMSO-Gruppe. Während in der Kontrollgruppe die Epithelialisierungswerte spenderabhängig variierten und so beispielsweise beide PDK, die mit HCEC von Spender 1 rezellularisiert worden waren (vgl. Tabelle 5), in einem vergleichbaren Bereich lagen (49,2 % und 41,5 %), war die Datenstreuung in der PBS-Gruppe spenderunabhängig (Spender 2: 87,0 % und 42,4 %; Spender 3: 87,9 %, 62,4 %).

Neben dem flächenbezogenen Rezellularisierungsmaß ermöglichte eine Beurteilung der Epithelstratifizierung eine präzisere Charakterisierung der ausgebildeten Epithelien (Abb. 17 b). Hierbei wurde sichtbar, dass in annähernd gleicher Verteilung zwischen den Gruppen zumeist einschichtiges Epithel vorlag, gefolgt von zwei- und schließlich drei- bzw. mehrschichtigem Epithel [120]. Allein die PDK der EM/Glycerol-Gruppe wiesen verglichen mit der Kontrollgruppe einen signifikant geringeren Anteil einschichtigen Epithels auf ( $p = .01$ ), zeigten jedoch im Vergleich zur Kontrolle keinen signifikanten Unterschied im Anteil von zwei- oder mehrschichtigem Epithel ( $p \geq .28$ ) [120].

## 4. Diskussion

Aufgrund der in Vorarbeiten gezeigten Stabilität und Biokompatibilität gilt die PDK als potenzielles Bindehautersatzgewebe [98, 99]. Eine routinierte klinische Anwendung der PDK erfordert eine längerfristige Lagerungsmöglichkeit. Letztere wurde für PDK nach derzeitigem Stand noch in keiner Studie beschrieben. Insgesamt liegen zur Lagerung dezellularisierter Gewebe aktuell nur wenige Studien vor.

In dieser Arbeit wurden für die Untersuchung der Effekte unterschiedlicher Lagerungsmethoden auf die EZM von PDK vielfältige Gewebeeigenschaften evaluiert. Hierzu zählen der Erhalt der Histologie sowie der Ultrastruktur, der Gehalt an funktionell bedeutsamen Strukturproteinen, die Biomechanik und die Fähigkeit der unterschiedlich aufbewahrten Matrices zur Reepithelialisierung. Die Methodenauswahl bietet die Möglichkeit einer umfassenden Gewebeuntersuchung und findet sich in feinen Variationen häufig in der Literatur zur Gewebecharakterisierung frischer und gelagerter dezellularisierter Gewebe [102, 103, 123].

### 4.1 Strukturerhalt

Einen gesamtheitlichen Eindruck von der Gewebestruktur lieferte die Histologie. Es wurden dieselben Spender für die verschiedenen Untergruppen genutzt, um Spendervariabilitäten zu reduzieren und bei vorliegender Stichprobengröße eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den PDK zu ermöglichen. In der Bildanalyse mittels ImageJ zeigte sich nach allen Lagerungsformen eine mit der Kontrollgruppe vergleichbare EZM-Architektur und Faserdichte, die sich auch nach einem Lagerungszeitraum von sechs Monaten nicht signifikant unterschied. Strukturelle Ähnlichkeit war somit zwischen den in PBS aufbewahrten und eingefrorenen PDK gegeben und eine Gewebedegradation nach PBS-Lagerung bestätigte sich für PDK bis zu einem Lagerungszeitraum von sechs Monaten nicht. Letzteres ist vor dem Hintergrund anderer Studien zur Lagerung dezellularisierter Gewebe bemerkenswert, da sich mehrere Publikationen trotz bisher insgesamt spärlicher Datenlage in der Schlussfolgerung überschneiden, dass eine sechs- und mehrmonatige Lagerung dezellularisierter Gewebe in PBS bei 4°C zu einer veränderten Gewebearchitektur und Auflockerung der EZM-Strukturen führen kann [102, 103, 105, 120]. Die

Autoren der zitierten Studien diskutierten die PBS-Lagerung dezellularisierter Gewebe daher eher als kurzfristige Lagerungsoption.

Im Gegensatz dazu konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass die Gewebestruktur porziner azellulärer Matrix nach zweimonatiger Lagerung in PBS unbeeinflusst blieb [124]. Wollmann et al. sahen bei der Lagerung von dezellularisierten humanen Herzklappen bis zu einem Lagerungszeitraum von 18 Monaten keine Strukturveränderungen der EZM [125].

Insgesamt ist zu berücksichtigen, dass sich die zitierten Studien auf dezellularisierte Gewebe verschiedener Organsysteme und Gewebe unterschiedlicher Spezies beziehen.

Eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse der vorliegenden Studie kann die Tatsache sein, dass die Anatomie der PDK mit den in den beschriebenen Studien untersuchten Geweben (Ösophagus, Trachea und Keimdrüsen) nicht ohne Einschränkungen verglichen werden kann [120]. Im Vergleich zu Letzteren ist die Konjunktiva deutlich dünner, weist eine homogenere Beschaffenheit auf und besteht in ihrer dezellularisierten Form ausschließlich aus lockerem Bindegewebe ohne weitere Gewebetypen wie Muskeln oder Knorpel. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass die beschriebene Auflockerungstendenz nach einem längeren als dem in dieser Arbeit untersuchten Lagerungszeitraum ebenfalls für PDK gelten kann.

Neben der Lagerung in PBS war die Untersuchung der PDK nach dem Einfrieren bzw. nach Kryokonservierung von Bedeutung: Aus mehreren Studien ist bekannt, dass Einfrier- und Auftauprozesse ohne den Zusatz von Kryoprotektiva einen schädlichen Einfluss auf den Verlauf und die strukturelle Integrität von Kollagenfasern in nativen Geweben mit hohem Kollagenanteil, z.B. Sehnen, haben und diese Effekte sich auch auf ihre Biomechanik auswirken können [126, 127]. Zudem ist beschrieben, dass eine steigende Anzahl an Gefrier- und Auftauzyklen die Gewebestruktur stärker schädigt, was auf eine wiederholte Bildung von Eiskristallen im Intra- und Extrazellulärraum zurückzuführen ist [126].

In der vorliegenden Studie wiesen die gefrorenen PDK einen guten Strukturerhalt nach sechsmonatiger Lagerung auf [120]. Dies deckt sich mit anderen Studien zur Kryokonservierung dezellularisierter Gewebe mit Kryoprotektiva [103, 105, 113], in denen ein Erhalt der EZM-Architektur bis zu einem Lagerungszeitraum von sechs Monaten nachgewiesen werden konnte.

TEM-Aufnahmen der PDK ermöglichten eine nähere Beurteilung der Kollagenbündel, der einzelnen Faserverläufe, Faserbegrenzungen und zudem die Darstellung von

Elastinstrukturen. Die TEM-Aufnahmen zeigten keine Unterschiede zwischen den PDK der verschiedenen Lagerungsgruppen. Es ließen sich weder Unterbrechungen von Faserläufen noch Herauslösungen von Kollagenstrukturen aus dem Faserverbund feststellen, wie sie sich elektronenmikroskopisch in einer Studie zur Lagerung dezellularisierter humaner Trachea in PBS (4 °C) über zwölf Monate gezeigt hatten [102].

Neben der Beurteilung der anatomischen Struktur ermöglichten Vergleiche des Kollagen- und Elastingehalts eine weitere EZM-Charakterisierung der gelagerten PDK. In der Literatur finden sich in Bezug auf den Proteinerhalt bei gelagerten dezellulierten Geweben unterschiedliche Angaben: So beobachteten beispielsweise Baiguera et al. bei dezellularisierter Trachea [102] und Gharenaz et al. in azellulären Maushoden [105] eine Schädigung der Kollagen- und Elastinstrukturen sowie einer Abnahme der Proteinmenge nach sechs- bzw. 12-monatiger Lagerung in Salzlösung. Eine Studie von Wollmann et al. für dezellularisierte Herzklappen ergab hingegen keine signifikante Reduktion von Kollagen und Elastin selbst nach einer Lagerungszeit in Salzlösung von 18 Monaten [120, 125]. In Bezug auf die Kryokonservierung konnte in mehreren Fällen der Erhalt der Proteine innerhalb azellulärer Matrices nachgewiesen werden [103-105].

In dieser Studie wurde für die Kollagenbestimmung mit einem Assay gearbeitet, der für den Nachweis von unlöslichem Kollagen der Typen I, II, III, V und XI geeignet ist [48]. Bei dieser Methode wurde ausschließlich mit Trockengewicht gearbeitet, um methodische Artefakte durch unterschiedliche Quellungs Zustände des Gewebes und damit unzuverlässige Gewichtsmessungen zu umgehen. Andere Arbeitsgruppen haben bei der Proteinquantifizierung von gelagertem dezelluliertem Gewebe einen Anstieg der Kollagenwerte beobachtet und führten diesen Umstand u.a. auf die Verwendung von Nassgewicht zurück [103, 123].

Mittels Proteinquantifizierung konnte gezeigt werden, dass alle Lagerungsmethoden auch nach sechs Monaten strukturell und funktionell wichtige Proteine der PDK konservieren. Eine leichte Tendenz zur Reduktion des Elastingehalts war in der EM/Glycerol-Gruppe nach sechsmonatiger Lagerung zu sehen. Allerdings korrelierte diese Beobachtung nicht mit den anderen Ergebnissen zur EZM-Morphologie und zu den biomechanischen Eigenschaften der PDK dieser Gruppe.

## 4.2 Biomechanik

Eine Hypothese dieser Studie war, dass Veränderungen der strukturellen und biochemischen Integrität der PDK nach Lagerung konsekutiv auch zu Abweichungen entscheidender biomechanischer Parameter führen können. Die Biomechanik im Kontext einer klinischen Anwendung konservierter PDK von großer Bedeutung, zumal ein ideales Bindegewebersatzgewebe sowohl im Hinblick auf die chirurgische Handhabbarkeit als auch auf die durch die Bulbusmotilität bedingte Beanspruchung *in vivo* stabil und zugfest sowie in gewissem Ausmaß auch elastisch und dehnbar sein sollte [20, 120].

Die biomechanischen Messungen erfolgten im Zugversuch, bei dem es sich um ein etabliertes und sehr sensitives Verfahren für die Prüfung von Materialeigenschaften wie der Elastizität, Zugfestigkeit und der Dehnbarkeit handelt. Auch für PDK sind bereits Zugversuche beschrieben [98].

Die Auswertungen des E-Moduls, der Zugfestigkeit und der Bruchdehnung ergaben bis auf eine Ausnahme keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Nur die Zugfestigkeit der EM/DMSO-Gruppe nach sechsmonatiger Lagerung war im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert [120]. Auch in den übrigen Lagerungsvarianten war nach sechs Monaten eine Abnahme der Zugfestigkeit zu beobachten. Innerhalb der PBS-Gruppe und EM/Glycerol-Gruppe waren die Unterschiede der Zugfestigkeit zwischen der Kontrolle und den PDK nach zweimonatiger Lagerung größer als zwischen letzteren und sechsmonatig gelagerten PDK.

Bemerkenswerterweise wiesen PDK nach zweimonatiger Kryokonservierung in EM/DMSO die höchste Zugfestigkeit unter den Gruppen auf. Dies erscheint insofern fragwürdig, als dass im Kontext einer lagerungsbedingten Reduktion der Zugfestigkeit kontinuierliche und additive Prozesse wahrscheinlicher sind als schlagartige Änderungen. Zudem lieferten weder die Histologie noch die Proteinquantifizierung der PDK der EM/DMSO-Gruppe nach sechsmonatiger Lagerungszeit Anhaltspunkte für Strukturveränderungen, die speziell für diese Lagerungsgruppe mit einer stärkeren Abnahme der Zugfestigkeit korrelieren würden als in den anderen Gruppen [120]. Insgesamt ist die beschriebene Signifikanz daher auch unter Berücksichtigung der später beschriebenen Limitationen dieser Methode eher mit Vorsicht zu interpretieren.

Neben der Reduktion der Zugfestigkeit zeigte sich nach einem Zeitraum von sechs Monaten bei allen Lagerungsgruppen eine Tendenz zur Reduktion des E-Moduls – ohne deutliche Abweichungen zwischen den einzelnen Lagerungsmethoden.

Bisherige Studien zur Biomechanik dezellularisierter Gewebe nach Lagerung kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen:

Eine einjährige Lagerung humaner dezellularisierter Trachea in PBS (4 °C) ergab eine signifikante Reduktion der Bruchdehnung um mehr als 50 % und eine nicht signifikante Mittelwertsreduktion der Zugfestigkeit von ebenfalls 50 % im Vergleich zu frisch dezellularisierter Trachea [102]. In Bezug auf die Kryokonservierung beschrieb eine Studie von Vinci et al. keine Veränderung des E-Moduls und der Zugfestigkeit nach kurzzeitiger Kryokonservierung dezellularisierten humanen Perikards verglichen mit frisch dezellularem Gewebe [109]. Ein genauer Lagerungszeitraum wird in der Studie nicht angegeben. Eine weitere Studie von Zouhair et al. zu dezellularem bovines Perikard zeigte nach einmonatiger Kryokonservierung unter DMSO-Zusatz ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der beiden Parameter im Vergleich zu frisch dezellularem Gewebe [104]. Narine et al. hingegen konnten nach Kryokonservierung porciner dezellularisierter Aortenklappen unter DMSO-Zusatz für mindestens zwei Wochen signifikant höhere Spannungswerte im Zugversuch als in frisch dezellulierten Aortenklappen nachweisen [111].

In der bereits zitierten Studie von Urbani et al. wurden längere Lagerungszeiträume bis zu sechs Monaten untersucht und die biomechanischen Eigenschaften dezellularisierter Kaninchenösophagi nach Lagerung in PBS (4°C) und einer Kryokonservierung unter DMSO-Zusatz nach jeweils zwei Wochen und sechs Monaten verglichen [103]. Die Autoren kamen zu dem bereits analog für die Histologie beschriebenen Ergebnis, dass eine Kryokonservierung unter Zusatz von DMSO die Zugfestigkeit des Gewebes nach sechsmonatiger Lagerung deutlich besser erhielt als eine Lagerung in PBS bei 4 °C, bei der die Zugfestigkeit um mehr als 60% abnahm, während sie nach Kryokonservierung nur eine minimale, nicht signifikante Reduktion aufwies [103]. Für das E-Modul konnten in der genannten Studie für beide Lagerungsmethoden nach sechs Monaten signifikante Reduktionen um mehr als 50 % im Vergleich zu einer zweiwöchigen Lagerung des Gewebes nach der gleichen Methode nachgewiesen werden.

In Anbetracht der vorliegenden Daten ist ein deutlicher Unterschied innerhalb der biomechanischen Eigenschaften zwischen den Lagerungsgruppen für PDK nicht zu bestätigen. Interessanterweise korreliert die Tendenz zur Reduktion des E-Moduls der sechsmonatig gelagerten PDK über alle Lagerungsmethoden hinweg mit den Beobachtungen der zuvor zitierten Studie zu dezellulierten Ösophagi. Das Gewebe zeigte also unabhängig von

der genauen Lagerungsmethode eine Tendenz zur Veränderung seiner elastischen Eigenschaften mit zunehmender Lagerungszeit.

Aus den genannten Aspekten ergibt sich die Frage nach dem Einfluss sowohl des Lagerungszeitraums als auch der speziellen Lagerungsmethode auf den Gewebeerhalt der PDK: Der Einfluss des Lagerungsmediums und die Bedeutung von Kryoprotektiva auf den EZM-Erhalt und die Biomechanik nativer kollagenreicher Gewebe beim Einfrieren und Auftauen werden in der Literatur widersprüchlich thematisiert. Mehrere Studien zeigen deutliche Vorzüge der Verwendung von Glycerol oder DMSO im Vergleich zum Einfrieren ohne Kryoprotektion auf und heben somit die Wichtigkeit eines geeigneten Lagerungsmediums speziell für das Einfrieren hervor [128-130].

Dennoch gibt es auch Studien, die die Bedeutung der Kryoprotektion für ausgewählte Gewebe hinterfragen [131, 132]. Poornejad et al. konnten zeigen, dass eine Kryokonservierung von dezellularisiertem porcinen Nierengewebe ohne Kryoprotektiva weit weniger Schäden innerhalb der EZM verursacht als in nativem Vergleichsgewebe [131]. Wagner et al. stellten in Bezug auf Amnionmembran keine signifikanten Unterschiede der Biomechanik nach Einfrieren ohne und mit Glycerol fest, wohl aber eine Veränderung der Biomechanik nach einem längeren Lagerungszeitraum unabhängig vom Lagerungsmedium [132].

Auch die vorliegenden Ergebnisse legen speziell unter Betrachtung der Mittelwerte nach sechsmonatiger Lagerung nahe, dass für den untersuchten Zeitraum der Einfluss des Lagerungszeitraums auf die Biomechanik der PDK größer ist als die Lagerungsmethode [120].

Die hohe Variabilität der Messwerte stellt allerdings eine Einschränkung bei der Interpretation der Ergebnisse dar. Die Standardabweichungen ergeben sich dabei unter anderem aus einer ausgeprägten Sensitivität des Zugversuches selbst in kleinen Kraftbereichen, durch die die Spendervariabilitäten mehr zum Tragen kommen. Die Varianz wird insbesondere innerhalb der Elastizitäts- und Zugfestigkeitsmessungen deutlich und ist auch in biomechanischen Messungen vielzähliger anderer Studien beobachtet worden (z.B. [112, 125, 130]). Neben spenderbedingten Unterschieden können trotz hoher Präzision schon kleine Variationen in der Durchführung des Zugversuches, beispielsweise voneinander abweichende Einspannzeiten in die Probenhalterung und sich hieraus ergebende unterschiedlich lange Austrocknungszeiten des Gewebes, zu messbaren Unterschieden der Biomechanik führen.

Diese Faktoren und darüber hinaus die Verwendung verschiedener Prüfprotokolle und Prüfungsgeschwindigkeiten führen letztlich auch dazu, dass absolute Werte der biomechanischen Parameter zwischen Studien nur eingeschränkt vergleichbar sind. So werden in der Literatur beispielsweise für das Elastizitätsmodul humaner Konjunktiva Werte zwischen 67 kPa und 3900 kPa angegeben, also Schwankungen um mehr als das 50-fache [51, 98, 100].

In Bezug auf die aktuelle Arbeit könnte ein weiterer Einflussfaktor auf die Messunterschiede zwischen den beiden untersuchten Lagerungszeiträumen teilweise im Studiendesign selbst begründet liegen. So wurden PK für die sechsmonatige Lagerung zu Beginn der Studie und vor den PK der anderen Gruppen präpariert und dezellularisiert. Auch wenn die PDK-Dicken innerhalb des Zugversuches vergleichbar waren, wurde zwar die Höhe und Breite, allerdings nicht die Dicke der PDK vermessen. Mögliche Dickenunterschiede der PDK durch feine und unbemerkte Anpassungen der Präparationstechnik im Verlauf der Studie sind nicht sicher auszuschließen. Methodische Alternativen zur Minimierung dieses Einflusses wäre daher im Nachhinein die Verwendung zeitgleich präparierter PDK, bei ausreichender PDK-Größe – wie es für die histologische Auswertung durchgeführt – eine spendergleiche Aufteilung auf die verschiedenen Gruppen, oder eine exakte Dickenmessung der PDK-Fragmente gewesen.

Neben der biomechanischen Prüfung war auch die chirurgische Handhabbarkeit wichtig. Hier zeigte sich, dass alle PDK dehnbar und auch bei stärkerer Kraftausübung reißfest waren. Trotz des Anspruchs der vorliegenden Studie, die Unterschiede der PDK-Gewebecharakteristika so präzise wie möglich zu erfassen, kommt daher die Frage auf, inwieweit die Unterschiede im Elastizitätsmodul und der Zugfestigkeit im Kontext eines chirurgischen Bindehautersatzes bedeutsam sein könnten. Für eine Einschätzung der klinischen Relevanz bietet es sich an, die Werte der biomechanischen Parameter von PDK in Relation zu klinisch bereits verbreiteten Bindehautersatzgeweben zu setzen und über die begrenzten Messbereiche der PDK hinaus zu blicken. Aufgrund der bereits beschriebenen limitierten Vergleichbarkeit von absoluten Messwerten sind besonders solche Publikationen interessant, in denen die biomechanischen Eigenschaften von DK innerhalb derselben Studie mit denen etablierter Bindehautersatzgewebe verglichen werden. So konnten Kasbekar et al. zeigen, dass das Elastizitätsmodul von HAM ca. vierfach und die Zugfestigkeit ca. dreifach höher war als von humaner DK [100]. In einer Studie von Witt et al. betrug die Zugfestigkeit der HAM das Vierfache und das Elastizitätsmodul mehr als das Doppelte der entsprechenden Parameter von PDK [98]. Relativ betrachtet waren die

ermittelten Unterschiede zwischen den PDK verschiedener Lagerungsgruppen somit eher geringfügig, so dass nach allen Lagerungsvarianten für den untersuchten Zeitraum von einem Erhalt wichtiger biochemischer Eigenschaften ausgegangen werden kann. In diesem Kontext ist zudem erwähnenswert, dass beim zurzeit am häufigsten verwendeten Bindehautersatzgewebe, der HAM, spender- und präparationsbedingte Variabilität und somit auch daraus resultierende biomechanische Abweichungen im klinischen Alltag in Kauf genommen werden und nicht zwangsläufig zu schlechterem postoperativem Transplantatverhalten führen [31, 34].

### 4.3 Reepithelialisierungsfähigkeit

Erkrankungen, die zu der Notwendigkeit einer Augenoberflächenrekonstruktion führen können, gehen häufig mit einem Schaden oder Verlust von konjunktivalen epithelialen Stammzellen einher, aus denen physiologisch sowohl CEC als auch Becherzellen hervorgehen [9, 133]. Die Regeneration der Bindehaut kann dadurch stark eingeschränkt werden oder ausbleiben. Für die Wiedererlangung der Physiologie der Augenoberfläche ist es also neben bloßer Defektdeckung erforderlich, dass ein strukturell und biomechanisch konserviertes Bindehauttransplantat *in vivo* biokompatibel und modellierbar ist sowie durch eine nicht-toxische, unterstützende Matrix Zellviabilität und Epithelbildung ermöglicht. Viele Studien zu bereits klinisch verbreiteten sowie noch näher zu erforschenden Ersatzgeweben für die Augenoberflächenrekonstruktion befassen sich daher mit der Rezellularisierungskapazität dieser Matrices [51, 89, 99, 134].

Dabei stellt die Rezellularisierungsfähigkeit keinen eigenständigen Aspekt des Gewebes dar. Dass die organspezifische Zusammensetzung der EZM und der Basalmembran in einem dynamischen Mikromilieu Zelladhäsion, -proliferation, -differenzierung und -metabolismus beeinflussen, wurde bereits vielfach beschrieben [58, 60, 64-68, 135]. Die Charakteristika einer potentiellen Zellenische sind somit eng mit der Mikrostruktur, der Biochemie und Biomechanik des Gewebes verflochten und haben auch Einfluss auf Stammzellen und ihre Differenzierung [136]. So ist insbesondere für Kollagen als bedeutendes Protein der EZM ein wachstums- und differenzierungsfördernder Einfluss auf HCEC beschrieben worden [42, 137]. Yang et al. beobachteten sogar eine Differenzierung von Amnionepithelzellen in konjunktivales Epithel, nachdem erstere in einem Homogenat aus DK kultiviert worden waren [138].

Für die Evaluation der Reepithelialisierungsfähigkeit der PDK in unserer Studie wurden revitalisierte primäre HCEC auf den gelagerten Matrices kultiviert. Die Tatsache, dass sich auf allen untersuchten PDK ein adhärentes, größtenteils ein- bis mehrschichtiges Epithel kultivieren ließ, machte deutlich, dass keine der Lagerungsformen zu einer deutlichen Einschränkung der Adhäsion, Viabilität und Proliferation der HCEC führte [120]. Die in jeder Gruppe vorhandenen Anteile mehrschichtigen Epithels zeigten ebenfalls eine Tendenz zur Epithelstratifizierung an, die für eine vorhandene Differenzierungsfähigkeit der HCEC sprach.

Dass das nach Verwendung einer Zellsuspension gebildete Epithel im Vergleich zu nativer Konjunktiva überwiegend weniger Zellschichten aufweist, war bereits durch die Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe bekannt [99]. Witt et al. beobachteten, dass bei Verwendung von Explantstücken, also dem direkten Auftragen von zerkleinerter Spenderkonjunktiva auf PDK, das entstehende Epithel schneller stratifizierte und insgesamt dicker war und führten dies auf eine erhaltene Nischenumgebung der CPC innerhalb der Explantstücke zurück. Aus dieser u.a. von Wachstumsfaktoren und Zytokinen beeinflussten Zellnische der Progenitorzellen sind HCEC in Suspensionskultur, die vor Aufbringung auf PDK trypsiniert wurden, herausgelöst.

Darüber hinaus ist bekannt, dass das Passagieren primärer HCEC, wie es auch in der vorliegenden Arbeit vor Rezellularisierung der PDK durchgeführt wurde, zu einer Verminderung ihrer proliferativen Kapazität führen kann [139]. Nach der Revitalisierung der HCEC ließ sich eine rasche Differenzierungstendenz innerhalb weniger Tage beobachten. In der vorliegenden Arbeit wurde die Zellsuspensionsmethode genutzt, um eine höhere Zellausbeute pro Spender zu erlangen und eine Rezellularisierung der PDK mit definierter Zellzahl zu garantieren.

Eine Limitation dieser Methode stellt mit Sicherheit die Vergleichbarkeit der Kultivierungsbedingungen auf den verschiedenen PDK dar. So wurde für diese Methode insgesamt auf drei humane Spenderkonjunktiven (s. Abschnitt 2.6.1, Tabelle 4 und 2.6.2, Tabelle 5) zurückgegriffen. Auch wenn das Spenderalter mit  $\approx 79,7 \pm 5,9$  Jahren und die Kultivierungsdauer vor (11-12 d) und nach Kryokonservierung (7-8 d) für alle HCEC ähnlich gewählt wurden, konnten durch Angleichungen dieser Bedingungen spezifische Spendervariabilitäten nicht umgangen werden, die vermutlich einen Grund für die hohen Standardabweichungen der Epithelialisierungswerte von zwei der vier Gruppen (PBS-Gruppe, EM/Glycerol-Gruppe) darstellten. Aber auch PDK, die mit HCEC desselben Spenders rezellularisiert worden waren, wiesen merkbliche Unterschiede innerhalb der

Epithelialisierungswerte auf. Vermutlich hätte eine Verlängerung der Kultivierungsdauer von 14 auf 21 Tage eine weitere Konfluenz des Epithels ermöglicht. Aus den Vorarbeiten zu diesem Projekt ist bekannt, dass der Epithelialisierungsprozess in der Suspensionskultur- im Vergleich zur Explantkultur-Methode langsamer abläuft und die Stratifizierung über den Zeitraum von zwei Wochen hinaus weiterhin andauert [99].

Insgesamt ließ sich feststellen, dass die mittlere Epithelialisierung der PDK über die Gruppen hinweg vergleichbar war. Nur die PDK der EM/DMSO-Gruppe zeigten eine Mittelwertsreduktion der Epithelialisierungswerte, die statistisch nicht signifikant war. Hier lässt sich diskutieren, ob potentiell in der Matrix verbliebene Rückstände von DMSO, bei dem in einer Vielzahl an Studien eine konzentrationsabhängige Zelltoxizität festgestellt wurde [140], im Zusammenhang mit einer verminderten Epithelbildung standen. Allerdings ist dies aufgrund der mehrmaligen Waschschriffe der gelagerten PDK und der Äquibrierung über Nacht vor Rezellularisierung in EM eher unwahrscheinlich. Selbst bei verbliebenen DMSO-Rückständen innerhalb der EZM wäre es fraglich, ob das Kryoprotektivum in einer derartig verdünnten Konzentration eine Zellwirkung gehabt haben könnte.

Mit gleicher Vorsicht sind allerdings auch die stärkere Epithelialisierungstendenz und der signifikant geringere Anteil einschichtigen Epithels der EM/Glycerol-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zu interpretieren. Die inter- und intra-donor-Variabilität erschweren einen präzisen Vergleich zwischen den PDK der verschiedenen Lagerungsgruppen. Um die Spendervariabilität zu verringern, könnten daher in zukünftigen Studien HCEC eines Spenders in gleicher Passage verwendet und zudem die Kultivierungsdauer verlängert werden.

Muzingefüllte, becherzelltypische Strukturen ließen sich nach Anwendung der aktuellen Rezellularisierungsmethode nicht nachweisen [120]. Aufgrund ihrer Bedeutung im Zusammenhang der Physiologie und Pathophysiologie der Konjunktiva sind Becherzellen zwar von großer Bedeutung für potenzielle Bindehautersatzgewebe, ihre Kultivierungsmöglichkeit *in vitro* ist allerdings eingeschränkt [4]. Dies zeigte sich auch in den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zur Reepithelialisierung von PDK, in denen Becherzellen nach der Explantkultur-Methode mit einer Kultivierungsdauer von 21 Tagen nachgewiesen werden konnten, allerdings zu keinem Zeitpunkt in der Suspensionskultur-Methode [99].

Das Fehlen von Becherzellen auf den gelagerten PDK in der aktuellen Arbeit scheint daher nicht unmittelbar auf den Lagerungsprozess der PDK zurückführbar zu sein. Erwähnenswert ist eine Studie von Meller et al., in der auf *in vitro* mit CEC rezellularisierter HAM erst nach einer Transplantation *in vivo* eine Becherzellendifferenzierung beobachtet werden konnte [141]. Dies deutet darauf hin, dass erhaltene Progenitorzeleigenschaften auf einer neuen Matrix auch eine nachträgliche Ausbildung von Becherzellen ermöglichen können, wenn geeignetere Nischenbedingungen vorherrschen.

#### **4.4 Schlussfolgerung und Ausblick**

Durch eine umfassende Charakterisierung unterschiedlich gelagerter PDK konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Lagerungsmethoden die EZM-Architektur, den Erhalt wichtiger Strukturproteine, die Biomechanik sowie die Reepithelialisierungsfähigkeit frisch dezellularisierter PDK für einen maximalen Zeitraum von sechs Monaten in überwiegend vergleichbarem Ausmaß konservieren [120]. Die PBS-Lagerung war dabei der Kryokonservierung der PDK in keinem der untersuchten Aspekte unterlegen. Diese Lagerungsvariante ist vergleichsweise einfach und ohne Einsatz von Kryoprotektiva durchführbar, sodass zeitaufwendige Waschschriffe nach der Lagerung nicht zwingend notwendig sind. Auch unter ökonomischen Gesichtspunkten stellt die Lagerung in PBS bei 4 °C im Vergleich zur Lagerung in Gefrierschränken oder Flüssigstickstoff eine kostengünstige Aufbewahrungsoption dar [120].

Die Möglichkeit einer unkomplizierten Lagerung ohne signifikante Funktionseinbußen des Ersatzgewebes vereinfacht weitere Untersuchungen dieses Gewebes und auch die perspektivische Anwendung der PDK in der Klinik. Zwar wurde mit einem anderen Dezellularisierungsverfahren gewonnene PDK kürzlich in wenigen Fällen im Rahmen einer Pterygium- und Symblepharonchirurgie am Menschen angewendet, allerdings fand die Transplantation hierbei direkt im Anschluss an die Dezellularisierung statt [101]. Mit der Kenntnis von geeigneten mehrmonatigen Lagerungsmöglichkeiten der PDK kann nun prinzipiell eine höhere Materialverfügbarkeit garantiert und eine größere zeitliche Flexibilität bezüglich des Operationszeitpunktes erreicht werden.

Aufbauend auf der vorliegenden Studie ist vor einer breiteren klinischen Anwendung gelagerter PDK jedoch ihre weitere Evaluation *in vivo* erforderlich, um zum einen die chirurgische Handhabbarkeit und zum anderen das Transplantatverhalten besser beurteilen

zu können. Es ist bekannt, dass es innerhalb transplantiertes EZM zu geweblichen Umbauvorgängen kommt, die unter anderem durch eine Infiltration des Ersatzgewebes durch monozytäre Zellen, eine Degradation und Neusynthese von EZM-Bestandteilen sowie Angiogeneseprozesse bedingt und mit dem Begriff *remodeling* beschrieben werden [142, 143].

Die gezeigte Rezellularisierungsfähigkeit gelagerter PDK auf der einen und die Kenntnis mehrerer Rezellularisierungstechniken auf der anderen Seite ermöglichen weiterführende Untersuchungen in diesem Bereich.

Da dezellularisiertes Gewebe durch die Entfernung von Zellbestandteilen eine stark reduzierte Immunogenität aufweist und der Verzicht auf Immunsuppressiva nach Transplantation einen großen Vorteil dieses Ersatzgewebes darstellt, rückt im Kontext eines klinischen Gebrauchs insbesondere auch die Rezellularisierung mit autologem Gewebe in den Vordergrund. Eine bereits präoperativ durchgeführte Rezellularisierung *in vitro* scheint sich nach bisheriger Datenlage bei Ersatzgeweben insgesamt und darunter auch dezellularisierten Geweben besonders positiv auf die Wundheilung und eine rasche Gewebeintegration auszuwirken. Auch das Risiko für Infektionen sowie Vernarbungs- und Degradationsprozesse wird durch eine Rezellularisierung der Matrix vor Transplantation reduziert, was bereits in mehreren Studien zu dezellularisierten Geweben gezeigt wurde [88, 134, 144]. Bemerkenswert sind in diesem Zusammenhang an Menschen beschriebene Transplantationen alleiniger autologer konjunktivaler Epithelzellschicht ohne Trägermatrix, die ebenfalls für eine Defektdeckung auf der Augenoberfläche geeignet waren und eine schnelle Wundheilung ermöglichten [145, 146].

Zukünftig denkbar ist eine autologe Rezellularisierung der PDK vor der Lagerung. Gerade bei schweren Schädigungen der Augenoberfläche durch progressive chronische Erkrankungen können das Vorhandensein und die Funktion von Stammzellen der Augenoberfläche eingeschränkt werden [147, 148]. Eine Rezellularisierung der PDK durch Biopsate aus geschädigter Konjunktiva, zum Beispiel bei Patienten mit vernarbenden Autoimmunerkrankungen, kann limitiert sein, sodass eine Gewinnung autologer Zellen in einem noch nicht fortgeschrittenen Krankheitsstadium effektiver wäre. Daneben wäre ein bereits rezellularisiertes Gewebe mit einer besseren Flexibilität in der Planung des Operationszeitpunktes und mit einer schnelleren Therapie verbunden. Für die Konservierung eines vorgefertigten Zell-Matrix-Konstruktes ist eine Lagerungsmethode erforderlich, die neben der Erhaltung der PDK-Matrix auch eine HCEC-Konservierung ermöglicht: In diesem Kontext rückt insbesondere die in dieser Studie angewandte EM/DMSO-

Lagerungsvariante in den Vordergrund, zumal bekannt ist, dass HCEC durch Kryokonservierung in einem gleichartig zusammengesetzten DMSO-haltigen Kryomedium ihre Stammzeleigenschaften und somit ihr proliferatives Potential beibehalten können [139]. Allerdings sind bei den beschriebenen potenziellen Forschungszielen einige Limitationen zu umgehen, die gerade im klinischen Kontext bedeutsam sind. So ist beispielsweise die Verwendung tierischer Bestandteile in Kulturmedien oder die Nutzung eines *feederlayers* aus murinen MMC-behandelten Fibroblasten für die *in vitro*-Kultivierung von HCEC im Kontext einer Zelltherapie unter anderem aus infektiologischer Sicht problematisch. Auf der Suche nach Kultivierungsbedingungen, in denen zum einen xenogene Einflüsse umgangen werden und zum anderen dennoch die proliferativen Eigenschaften der HCEC weitestgehend unbeeinträchtigt bleiben, beschrieben Schrader et al. eine geeignete Methode der Kokultivierung von HCEC mit humanen konjunktivalen Fibroblasten unter gutem Erhalt von Progenitoreigenschaften der konjunktivalen Zellen [149]. Hierbei konnte bei der HCEC-Kultivierung auf die Verwendung muriner Zellen und xenogenen Serums verzichtet werden. Auch die bereits genannte Explantkultur von HCEC auf PDK stellt durch die Beibehaltung einer körpereigenen Zellenische für den Fall einer autologen Zelltherapie eine vielversprechende Option dar.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Lagerung in PBS, das Einfrieren in EM/Glycerol sowie die Kryokonservierung in EM/DMSO dazu geeignet sind, um PDK unter Erhalt ihrer strukturellen und biomechanischen Eigenschaften für mindestens sechs Monate zu lagern. Alle untersuchten PDK konnten reepithelialisiert werden, was eine Zytotoxizität der Lagerungsmethoden unwahrscheinlich macht. Dies legt eine erhaltene Biokompatibilität für eine perspektivische Anwendung *in vivo* nahe [120].

## 5. Literaturverzeichnis

1. Salmon, J.F., *Bindehaut (Konjunktiva)*, in *Kanski's Klinische Ophthalmologie: Ein systematischer Ansatz*. 2022, Elsevier Health Sciences: München. p. 165-166.
2. Welsch, U., W. Kummer, and T. Deller, *Sehorgan*, in *Histologie- Lehrbuch und Atlas*. 2022, Elsevier Health Sciences: München. p. 628-630.
3. Tsubota, K., S.C. Tseng, and M.L. Nordlund, *Anatomy and physiology of the ocular surface*, in *Ocular Surface Disease Medical and Surgical Management*. 2002, Springer. p. 3-15.
4. Gipson, I.K., *Goblet cells of the conjunctiva: A review of recent findings*. Progress in Retinal and Eye Research, 2016. **54**: p. 49-63.
5. Knop, N. and E. Knop, *Conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2000. **41**(6): p. 1270-1279.
6. De Paiva, C.S., et al., *Dry eye-induced conjunctival epithelial squamous metaplasia is modulated by interferon- $\gamma$* . Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2007. **48**(6): p. 2553-2560.
7. Gipson, I.K. and P. Argüeso, *Role of Mucins in the Function of the Corneal and Conjunctival Epithelia*. International Review of Cytology, 2003. **231**: p. 1-49.
8. Shapiro, M., J. Friend, and R. Thoft, *Corneal re-epithelialization from the conjunctiva*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1981. **21**(1): p. 135-142.
9. Wei, Z.G., T.T. Sun, and R.M. Lavker, *Rabbit conjunctival and corneal epithelial cells belong to two separate lineages*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1996. **37**(4): p. 523-33.
10. Wei, Z.G., et al., *In vitro growth and differentiation of rabbit bulbar, fornix, and palpebral conjunctival epithelia. Implications on conjunctival epithelial transdifferentiation and stem cells*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1993. **34**(5): p. 1814-28.
11. Wei, Z.G., et al., *Label-retaining cells are preferentially located in fornical epithelium: implications on conjunctival epithelial homeostasis*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1995. **36**(1): p. 236-46.
12. Stewart, R.M., et al., *Human conjunctival stem cells are predominantly located in the medial canthal and inferior forniceal areas*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2015. **56**(3): p. 2021-2030.
13. Pellegrini, G., et al., *Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface*. The Journal of Cell Biology, 1999. **145**(4): p. 769-782.
14. Ralph, R.A., *Conjunctival goblet cell density in normal subjects and in dry eye syndromes*. Investigative Ophthalmology 1975. **14**(4): p. 299-302.
15. Chiou, A.G., G.J. Florakis, and M. Kazim, *Management of conjunctival cicatrizing diseases and severe ocular surface dysfunction*. Survey of Ophthalmology, 1998. **43**(1): p. 19-46.
16. Chui, J., et al., *Ophthalmic pterygium: a stem cell disorder with premalignant features*. The American Journal of Pathology, 2011. **178**(2): p. 817-27.
17. Ang, L.P. and D.T. Tan, *Ocular surface stem cells and disease: current concepts and clinical applications*. Annals of the Academy of Medicine, Singapore, 2004. **33**(5): p. 576-80.

18. Zhao, D., et al., *Sealing of the gap between the conjunctiva and tenon capsule to improve symblepharon surgery*. American Journal of Ophthalmology, 2015. **160**(3): p. 438-446 e1.
19. Spaniol, K., et al., *Bindehautrekonstruktion – Status quo regenerativer Therapieformen jenseits des Limbus*. Die Ophthalmologie, 2022. **119**(9): p. 902-909.
20. Spaniol, K., et al., *[New approaches to ocular surface reconstruction beyond the cornea]*. Ophthalmologie, 2017. **114**(4): p. 307-317.
21. Schrader, S., et al., *Tissue engineering for conjunctival reconstruction: established methods and future outlooks*. Current Eye Research, 2009. **34**(11): p. 913-24.
22. Argueso, P. and I.K. Gipson, *Epithelial mucins of the ocular surface: structure, biosynthesis and function*. Experimental Eye Research, 2001. **73**(3): p. 281-9.
23. De Rötth, A., *Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes*. Archives of Ophthalmology, 1940. **23**(3): p. 522-525.
24. Lee, S.-H. and S.C. Tseng, *Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration*. American Journal of Ophthalmology, 1997. **123**(3): p. 303-312.
25. Kim, J.C. and S.C. Tseng, *Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas*. Cornea, 1995. **14**(5): p. 473-84.
26. Tseng, S.C., et al., *How does amniotic membrane work? The Ocular Surface*, 2004. **2**(3): p. 177-187.
27. Shimmura, S., et al., *Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders*. Cornea, 2001. **20**(4): p. 408-413.
28. Dua, H.S. and A. Azuara-Blanco, *Amniotic membrane transplantation*. British Journal of Ophthalmology, 1999. **83**(6): p. 748-52.
29. Solomon, A., et al., *Suppression of interleukin 1 $\alpha$  and interleukin 1 $\beta$  in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix*. British Journal of Ophthalmology, 2001. **85**(4): p. 444-449.
30. Tseng, S., *Down-regulation of TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 and TGG- $\beta$  receptor II expression in human corneal fibroblasts by amniotic membrane*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1998. **39**.
31. Hopkinson, A., et al., *Amniotic membrane for ocular surface reconstruction: donor variations and the effect of handling on TGF-beta content*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2006. **47**(10): p. 4316-22.
32. Thomasen, H., et al., *Gute fachliche Praxis zur Gewinnung und Herstellung von kryokonservierter humaner Amnionmembran aus Spenderplazenta*. Der Ophthalmologe, 2018. **115**(10): p. 855-867.
33. Dua, H., et al., *Variations in amniotic membrane: relevance for clinical applications*. British Journal of Ophthalmology, 2010.
34. Connon, C.J., et al., *The variation in transparency of amniotic membrane used in ocular surface regeneration*. British Journal of Ophthalmology, 2010. **94**(8): p. 1057-1061.
35. Allan, B.D., et al., *Pterygium excision with conjunctival autografting: an effective and safe technique*. British Journal of Ophthalmology, 1993. **77**(11): p. 698-701.
36. Clearfield, E., et al., *Conjunctival autograft for pterygium*. Cochrane Database Syst Rev, 2016. **2**(2): p. CD011349.

37. Borrelli, M., et al., *Eye Socket Regeneration and Reconstruction*. Current Eye Research, 2020. **45**(3): p. 253-264.
38. Mai, C. and E. Bertelmann, *Oral mucosal grafts: old technique in new light*. Ophthalmic Research, 2013. **50**(2): p. 91-8.
39. Nakamura, T. and S.J.C. Kinoshita, *Ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial stem cells*. Cornea, 2003. **22**(7): p. S75-S80.
40. Kim, J.H., et al., *Ocular surface reconstruction with autologous nasal mucosa in cicatricial ocular surface disease*. American Journal of Ophthalmology, 2010. **149**(1): p. 45-53.
41. Hussey, G.S., J.L. Dziki, and S.F. Badylak, *Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine*. Nature Reviews Materials, 2018. **3**(7): p. 159-173.
42. Karesh, J., M. Fabrega, and M. Rodrigues, *Interpositional polytetrafluoroethylene grafts. Conjunctival biocompatibility*. Ophthalmic Plastic Reconstructive Surgery, 1991. **7**(4): p. 278-283.
43. Karesh, J.W., *Polytetrafluoroethylene as a graft material in ophthalmic plastic and reconstructive surgery. An experimental and clinical study*. Ophthalmic Plastic Reconstructive Surgery, 1987. **3**(3): p. 179-185.
44. Levin, P.S. and J.J. Dutton, *Polytef (polytetrafluoroethylene) alloplastic grafting as a substitute for mucous membrane*. Archives of Ophthalmology, 1990. **108**(2): p. 282-285.
45. Lu, Q., et al., *Biomaterials and Tissue Engineering Strategies for Conjunctival Reconstruction and Dry Eye Treatment*. Middle East African Journal of Ophthalmology, 2015. **22**(4): p. 428-34.
46. Lee, S.Y., et al., *In vivo conjunctival reconstruction using modified PLGA grafts for decreased scar formation and contraction*. Biomaterials, 2003. **24**(27): p. 5049-5059.
47. Jauregui, H.O., *Cell adhesion to biomaterials: the role of several extracellular matrix components in the attachment of non-transformed fibroblasts and parenchymal cells*. ASAIO Journal, 1987. **33**(2): p. 66-74.
48. Dake, Y., et al., *Immunohistochemical localization of collagen types I, II, III, and IV in pterygium tissues*. Acta histochemica, 1989. **87**(1): p. 71-74.
49. Abou Neel, E.A., et al., *Use of multiple unconfined compression for control of collagen gel scaffold density and mechanical properties*. Soft Matter, 2006. **2**(11): p. 986-992.
50. Brown, R.A., et al., *Ultrarapid engineering of biomimetic materials and tissues: Fabrication of nano-and microstructures by plastic compression*. Advanced Functional Materials, 2005. **15**(11): p. 1762-1770.
51. Drechsler, C.C., et al., *Development of a conjunctival tissue substitute on the basis of plastic compressed collagen*. Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2017. **11**(3): p. 896-904.
52. Calderón-Colón, X., et al., *Structure and properties of collagen vitrigel membranes for ocular repair and regeneration applications*. Biomaterials, 2012. **33**(33): p. 8286-8295.
53. Takezawa, T., et al., *Collagen vitrigel: a novel scaffold that can facilitate a three-dimensional culture for reconstructing organoids*. Cell Transplantation, 2004. **13**(4): p. 463-474.
54. Zhou, H., et al., *Vitrified collagen-based conjunctival equivalent for ocular surface reconstruction*. Biomaterials, 2014. **35**(26): p. 7398-406.

55. Dehghani, S., et al., *3D-Printed membrane as an alternative to amniotic membrane for ocular surface/conjunctival defect reconstruction: An in vitro & in vivo study*. *Biomaterials*, 2018. **174**: p. 95-112.
56. Nakamura, N., T. Kimura, and A. Kishida, *Overview of the Development, Applications, and Future Perspectives of Decellularized Tissues and Organs*. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2017. **3**(7): p. 1236-1244.
57. Crapo, P.M., T.W. Gilbert, and S.F. Badylak, *An overview of tissue and whole organ decellularization processes*. *Biomaterials*, 2011. **32**(12): p. 3233-43.
58. Rozario, T. and D.W. DeSimone, *The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view*. *Developmental Biology*, 2010. **341**(1): p. 126-40.
59. Kular, J.K., S. Basu, and R.I. Sharma, *The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering*. *Journal of Tissue Engineering*, 2014. **5**: p. 2041731414557112.
60. Bissell, M., H. Hall, and G. Parry, *How does the extracellular matrix direct gene expression?* *Journal of Theoretical Biology*, 1982. **99**(1): p. 31-68.
61. Wang, M., et al., *Role of tumor microenvironment in tumorigenesis*. *Cancer*, 2017. **8**(5): p. 761-773.
62. Schultz, G.S. and A. Wysocki, *Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing*. *Wound Repair Regeneration*, 2009. **17**(2): p. 153-162.
63. Mott, J.D. and Z. Werb, *Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases*. *Current Opinion in Cell Biology*, 2004. **16**(5): p. 558-64.
64. DuFort, C.C., M.J. Paszek, and V.M. Weaver, *Balancing forces: architectural control of mechanotransduction*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2011. **12**(5): p. 308-19.
65. Guilak, F., et al., *Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix*. *Cell Stem Cell*, 2009. **5**(1): p. 17-26.
66. Frisch, S.M. and H. Francis, *Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis*. *Journal of Cell Biology*, 1994. **124**(4): p. 619-26.
67. Winer, J.P., et al., *Bone marrow-derived human mesenchymal stem cells become quiescent on soft substrates but remain responsive to chemical or mechanical stimuli*. *Tissue Engineering Part A*, 2009. **15**(1): p. 147-54.
68. Allen, R.A., et al., *Adrenal extracellular matrix scaffolds support adrenocortical cell proliferation and function in vitro*. *Tissue Engineering Part A*, 2010. **16**(11): p. 3363-74.
69. Hillebrandt, K.H., et al., *Strategies based on organ decellularization and recellularization*. *Transplant International*, 2019. **32**(6): p. 571-585.
70. Badylak, S.F., D. Taylor, and K. Uygun, *Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds*. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2011. **13**: p. 27-53.
71. Hassanein, W., et al., *Recellularization via the bile duct supports functional allogenic and xenogenic cell growth on a decellularized rat liver scaffold*. *Organogenesis*, 2017. **13**(1): p. 16-27.
72. Peloso, A., et al., *Current achievements and future perspectives in whole-organ bioengineering*. *Stem Cell Research & Therapy*, 2015. **6**(1): p. 1-12.
73. Ott, H.C., et al., *Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart*. *Nature Medicine*, 2008. **14**(2): p. 213-221.

74. Huston, T.L., B. Taback, and C.H. Rohde, *Chest wall reconstruction with porcine acellular dermal matrix (strattice) and a latissimus myocutaneous flap*. *The American Surgeon*, 2011. **77**(6): p. e115-6.
75. McCord, C., et al., *Use of porcine acellular dermal matrix (Enduragen) grafts in eyelids: A review of 69 patients and 129 eyelids*. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2008. **122**(4): p. 1206-1213.
76. Pahari, M.P., et al., *Development of a bioartificial new intestinal segment using an acellular matrix scaffold*. *Gut*, 2007. **56**(6): p. 885-886.
77. Erdbrügger, W., et al., *Decellularized xenogenic heart valves reveal remodeling and growth potential in vivo*. *Tissue Engineering*, 2006. **12**(8): p. 2059-2068.
78. Gomoll, A.H., *Osteochondral allograft transplantation using the chondrofix implant*. *Operative Techniques in Sports Medicine*, 2013. **21**(2): p. 90-94.
79. Wainwright, D.J., *Use of an Acellular Allograft Dermal Matrix (AlloDerm) in the Management of Full-Thickness Burns*. *Burns*, 1995. **21**(4): p. 243-248.
80. Breuing, K.H. and S.M. Warren, *Immediate Bilateral Breast Reconstruction With Implants and Inferolateral AlloDerm Slings*. *Annals of Plastic Surgery*, 2005. **55**(3): p. 232-239.
81. Buinewicz, B. and B. Rosen, *Acellular cadaveric dermis (AlloDerm): a new alternative for abdominal hernia repair*. *Annals of Plastic Surgery*, 2004. **52**(2): p. 188-94.
82. Bolton, W.D., et al., *Reconstruction of a long-segment tracheal defect using an AlloDerm conduit*. *Innovations (Philadelphia, Pa.)*, 2017. **12**(2): p. 137-139.
83. Haney, N.M., et al., *Acellular Dermal Matrix Tissues in Genitourinary Reconstructive Surgery: A Review of the Literature and Case Discussions*. *Sexual Medicine Reviews*, 2021. **9**(3): p. 488-497.
84. Rubin, P.A., et al., *Ophthalmic plastic applications of acellular dermal allografts*. *Ophthalmology*, 1999. **106**(11): p. 2091-7.
85. Chang, M., S.E. Ahn, and S. Baek, *The effect and applications of acellular dermal allograft (AlloDerm) in ophthalmic plastic surgery*. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 2014. **42**(5): p. 695-9.
86. Park, S.J., Y. Kim, and S.Y. Jang, *The application of an acellular dermal allograft (AlloDerm) for patients with insufficient conjunctiva during evisceration and implantation surgery*. *Eye (London)*, 2018. **32**(1): p. 136-141.
87. Atala, A., et al., *Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty*. *The Lancet*, 2006. **367**(9518): p. 1241-1246.
88. Raya-Rivera, A., et al., *Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study*. *The Lancet*, 2011. **377**(9772): p. 1175-1182.
89. Haagdoorens, M., et al., *Limbal Stem Cell Deficiency: Current Treatment Options and Emerging Therapies*. *Stem Cells International*, 2016. **2016**: p. 9798374.
90. Macchiarini, P., et al., *Clinical transplantation of a tissue-engineered airway*. *The Lancet*, 2008. **372**(9655): p. 2023-2030.
91. Taylor, D.A., et al., *Decellularized matrices in regenerative medicine*. *Acta Biomaterialia*, 2018. **74**: p. 74-89.
92. Hussein, K.H., et al., *Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application*. *Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications*, 2016. **67**: p. 766-778.
93. Freytes, D.O., R.M. Stoner, and S.F. Badylak, *Uniaxial and biaxial properties of terminally sterilized porcine urinary bladder matrix scaffolds*. *Journal of*

- Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2008. **84B**(2): p. 408-414.
94. Sun, W.Q. and P. Leung, *Calorimetric study of extracellular tissue matrix degradation and instability after gamma irradiation*. Acta Biomaterialia, 2008. **4**(4): p. 817-26.
  95. Fishman, J.A. and C. Patience, *Xenotransplantation: infectious risk revisited*. American Journal of Transplantation, 2004. **4**(9): p. 1383-90.
  96. Kallenbach, K., et al., *Guided tissue regeneration: porcine matrix does not transmit PERV*. Biomaterials, 2004. **25**(17): p. 3613-20.
  97. Naso, F., et al., *First quantitative assay of alpha-Gal in soft tissues: presence and distribution of the epitope before and after cell removal from xenogeneic heart valves*. Acta Biomaterialia, 2011. **7**(4): p. 1728-34.
  98. Witt, J., et al., *Decellularised conjunctiva for ocular surface reconstruction*. Acta Biomaterialia, 2018. **67**: p. 259-269.
  99. Witt, J., et al., *Decellularized porcine conjunctiva as an alternative substrate for tissue-engineered epithelialized conjunctiva*. The Ocular Surface, 2020. **18**(4): p. 901-911.
  100. Kasbekar, S., et al., *Development of decellularized conjunctiva as a substrate for the ex vivo expansion of conjunctival epithelium*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2018. **12**(2): p. e973-e982.
  101. Zhao, L., et al., *Ocular surface repair using decellularized porcine conjunctiva*. Acta Biomaterialia, 2020. **101**: p. 344-356.
  102. Baiguera, S., et al., *Long-term changes to in vitro preserved bioengineered human trachea and their implications for decellularized tissues*. Biomaterials, 2012. **33**(14): p. 3662-3672.
  103. Urbani, L., et al., *Long-term cryopreservation of decellularised oesophagi for tissue engineering clinical application*. PloS one, 2017. **12**(6): p. e0179341.
  104. Zouhair, S., et al., *Preservation strategies for decellularized pericardial scaffolds for off-the-shelf availability*. Acta Biomaterialia, 2019. **84**: p. 208-221.
  105. Gharenaz, N.M., M. Movahedin, and Z. Mazaheri, *Comparison of two methods for prolong storage of decellularized mouse whole testis for tissue engineering application: An experimental study*. International Journal of Reproductive BioMedicine, 2021. **19**(4): p. 321-332.
  106. Díaz-Moreno, E., et al., *Evaluation of freeze-drying and cryopreservation protocols for long-term storage of biomaterials based on decellularized intestine*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2018. **106**(2): p. 488-500.
  107. Bakhach, J., *The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues*. Organogenesis, 2009. **5**(3): p. 119-26.
  108. Brockbank, K.G., et al., *Ice-free cryopreservation of heart valve allografts: better extracellular matrix preservation in vivo and preclinical results*. Cell Tissue Bank, 2012. **13**(4): p. 663-71.
  109. Vinci, M.C., et al., *Mechanical compliance and immunological compatibility of fixative-free decellularized/cryopreserved human pericardium*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e64769.
  110. Theodoridis, K., et al., *Effects of combined cryopreservation and decellularization on the biomechanical, structural and biochemical properties of porcine pulmonary heart valves*. Acta Biomaterialia, 2016. **43**: p. 71-77.

111. Narine, K., et al., *Readily available porcine aortic valve matrices for use in tissue valve engineering. Is cryopreservation an option?* Cryobiology, 2006. **53**(2): p. 169-81.
112. Theodoridis, K., et al., *Effects of combined cryopreservation and decellularization on the biomechanical, structural and biochemical properties of porcine pulmonary heart valves.* Acta biomaterialia, 2016. **43**: p. 71-77.
113. Chani, B., et al., *Decellularized scaffold of cryopreserved rat kidney retains its recellularization potential.* PLoS One, 2017. **12**(3): p. e0173040.
114. Livesey, S.A., et al., *Transplanted acellular allograft dermal matrix. Potential as a template for the reconstruction of viable dermis.* Transplantation, 1995. **60**(1): p. 1-9.
115. Bottino, M.C., et al., *Freeze-dried acellular dermal matrix graft: effects of rehydration on physical, chemical, and mechanical properties.* Dental Materials, 2009. **25**(9): p. 1109-15.
116. Yang, J., H. Dang, and Y. Xu, *Recent advancement of decellularization extracellular matrix for tissue engineering and biomedical application.* Artificial Organs, 2022. **46**(4): p. 549-567.
117. Polak, R. and R.N. Pitombo, *Care during freeze-drying of bovine pericardium tissue to be used as a biomaterial: a comparative study.* Cryobiology, 2011. **63**(2): p. 61-6.
118. Wang, S., et al., *Sucrose Diffusion in Decellularized Heart Valves for Freeze-Drying.* Tissue Engineering Part C Methods, 2015. **21**(9): p. 922-31.
119. Gattazzo, F., A. Urciuolo, and P. Bonaldo, *Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche.* Biochimica et Biophysica Acta, 2014. **1840**(8): p. 2506-19.
120. Skornia, A., et al., *Influence of Storage Conditions on Decellularized Porcine Conjunctiva.* Bioengineering (Basel), 2023. **10**(3).
121. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis.* Nature Methods, 2012. **9**(7): p. 671-5.
122. Llames, S., et al., *Feeder layer cell actions and applications.* Tissue Engineering Part B: Reviews, 2015. **21**(4): p. 345-353.
123. Giobbe, G.G., et al., *Preservation over time of dried acellular esophageal matrix.* Biomedical Physics & Engineering Express, 2018. **4**(6): p. 065021.
124. Jungebluth, P., et al., *Structural and morphologic evaluation of a novel detergent-enzymatic tissue-engineered tracheal tubular matrix.* The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2009. **138**(3): p. 586-593.
125. Wollmann, L.C., et al., *Histological and Biomechanical Characteristics of Human Decellularized Allograft Heart Valves After Eighteen Months of Storage in Saline Solution.* Biopreservation and Biobanking, 2020. **18**(2): p. 90-101.
126. Chen, L., et al., *Effect of repeated freezing-thawing on the Achilles tendon of rabbits.* Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, 2011. **19**(6): p. 1028-34.
127. Giannini, S., et al., *Effects of freezing on the biomechanical and structural properties of human posterior tibial tendons.* International Orthopaedics, 2008. **32**(2): p. 145-51.
128. Suhodolčan, L., et al., *Cryopreservation with glycerol improves the in vitro biomechanical characteristics of human patellar tendon allografts.* Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, 2013. **21**(5): p. 1218-1225.

129. Hochstrat, E., et al., *Cryopreservation of tendon tissue using dimethyl sulfoxide combines conserved cell vitality with maintained biomechanical features*. PloS One, 2019. **14**(4): p. e0215595.
130. Wood, J.M., et al., *The biomechanical and histological sequelae of common skin banking methods*. Journal of Biomechanics, 2014. **47**(5): p. 1215-9.
131. Poornejad, N., et al., *Freezing/Thawing without Cryoprotectant Damages Native but not Decellularized Porcine Renal Tissue*. Organogenesis, 2015. **11**(1): p. 30-45.
132. Wagner, M., et al., *Cryopreservation of amniotic membrane with and without glycerol additive*. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 2018. **256**(6): p. 1117-1126.
133. Lavker, R.M. and T.T. Sun, *Epithelial stem cells: the eye provides a vision*. Eye (London), 2003. **17**(8): p. 937-42.
134. Ang, L.P., et al., *Autologous cultivated conjunctival transplantation for pterygium surgery*. American Journal of Ophthalmology, 2005. **139**(4): p. 611-9.
135. Adams, J.C. and F.M. Watt, *Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix*. Development, 1993. **117**(4): p. 1183-98.
136. Spradling, A., D. Drummond-Barbosa, and T. Kai, *Stem cells find their niche*. Nature 2001. **414**(6859): p. 98-104.
137. Tsai, R. and S. Tseng, *Substrate modulation of cultured rabbit conjunctival epithelial cell differentiation and morphology*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1988. **29**(10): p. 1565-1576.
138. Yang, S.P., X.Z. Yang, and G.P. Cao, *Conjunctiva reconstruction by induced differentiation of human amniotic epithelial cells*. Genetics and Molecular Research, 2015. **14**(4): p. 13823-34.
139. Schrader, S., et al., *Conjunctival epithelial cells maintain stem cell properties after long-term culture and cryopreservation*. Regenerative Medicine, 2009. **4**(5): p. 677-87.
140. Best, B.P., *Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions*. Rejuvenation Research, 2015. **18**(5): p. 422-436.
141. Meller, D., V. Dabul, and S.C. Tseng, *Expansion of conjunctival epithelial progenitor cells on amniotic membrane*. Experimental Eye Research, 2002. **74**(4): p. 537-45.
142. Badylak, S.F. *The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction*. in *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2002. Elsevier.
143. Badylak, S.F., D.O. Freytes, and T.W. Gilbert, *Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function*. Acta Biomaterialia, 2009. **5**(1): p. 1-13.
144. De Filippo, R.E., J.J. Yoo, and A. Atala, *Urethral replacement using cell seeded tubularized collagen matrices*. The Journal of Urology, 2002. **168**(4 Part 2): p. 1789-1793.
145. Scuderi, N., et al., *Transplantation of autologous cultivated conjunctival epithelium for the restoration of defects in the ocular surface*. Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery, 2002. **36**(6): p. 340-348.
146. Mancino, R., et al., *Autologous conjunctival epithelium transplantation and scleral patch graft for postlensectomy wound leakage in Marfan syndrome*. European Journal of Ophthalmology, 2012. **22**(5): p. 830-833.
147. Ahmad, S., *Concise Review: Limbal Stem Cell Deficiency, Dysfunction, and Distress*. Stem Cells Translational Medicine, 2012. **1**(2): p. 110-115.

148. Ramos, T., D. Scott, and S. Ahmad, *An update on ocular surface epithelial stem cells: cornea and conjunctiva*. Stem Cells International, 2015. **2015**.
149. Schrader, S., et al., *Simulation of an in vitro niche environment that preserves conjunctival progenitor cells*. Regenerative Medicine, 2010. **5**(6): p. 877-889.

## 6. Anhang

### Nr. 1: Histologie – Entwässerungsprotokoll

Chemikalien	Hersteller	Dauer (min)
70 % EtOH	Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland	55
90 % EtOH		120
100 % EtOH I		135
100 % EtOH II		190
100 % EtOH III		100
Xylol I	VWR Chemicals, Radnor, Pennsylvania, USA	75
Xylol II		60
Paraffin I	Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland	90
Paraffin II		180

### Nr. 2: Protokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Schritt	Chemikalien	Hersteller	Dauer (min)	Detail
1.	Xylol I	VWR Chemicals, Radnor, Pennsylvania, USA	5	Entparaffinierung
2.	Xylol II		5	
3.	Xylol III		5	
4.	99 % EtOH	Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland	5	Wässerung
5.	96 % EtOH		5	
6.	70 % EtOH		5	
7.	dest. H <sub>2</sub> O		3	
8.	Hämatoxylin	Hämalaunlösung nach Mayer, Roth, Karlsruhe	5	Färbung
9.	Leitungswasser		5	
10.	Eosin	Eosin G-Lösung 0,5 %, Roth, Karlsruhe	3	
11.	70 % EtOH	s.o.	kurz	Entwässerung
12.	96 % EtOH		3	
13.	99 % EtOH I		4	

14.	99 % EtOH II	s.o.	5	
15.	Xylol I	s.o.	5	
16.	Xylol II		5	
17.	Xylol III		5	
18.	Eindecken mit Roti Histokitt (Roth, Karlsruhe, Deutschland)			

### Nr. 3: TEM – Fixierungs- und Einbettungsprotokoll

Vorgang	Materialien und Hersteller	Dauer
Fixierung	4 % Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 2,5 % Glutaraldehyd (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland) in 0,1 M Cacodylatpuffer (Serva) bei pH 7,4	3 d bei 4 °C
Entwässerung und Blockkontrastierung	0,1 M Cacodylatpuffer	3 × 10 min
	1 % Osmiumtetroxid (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA) in 0,1 M Cacodylatpuffer	2 h
	0,1 M Cacodylatpuffer	3 × 10 min
	Aufsteigende Acetonreihe (30 % - 50 % - 70 %, Merck)	Je 20 min
	1 % Phosphorwolframsäure (Merck) und 0,5 % Uranylacetat (Merck) in 70 % Aceton	1 h
	70 % Aceton	ü. N.
	90 % Aceton	2 × 30 min
	abs. Aceton	2 × 30 min
Einbettung	abs. Aceton / Spurr (Serva) – Gemisch (2+1)	1 h
	abs. Aceton / Spurr – Gemisch (1+2)	1 h
	reines Spurr	2 h
	reines Spurr (frisch)	ü.N.
	reines Spurr (frisch)	4 h
	Polymerisation bei 70 °C im Wärmeschrank (Mettler, Schwabach, Deutschland)	ü. N.

**Nr. 4: Übersichtsaufnahme rezellularisierter PDK**



**Abb. 18: Exemplarische zusammengesetzte Aufnahme eines rezellularisierten PDK-Abschnitts. Einzelaufnahmen in  $200\times$  Vergrößerung, Maßstab =  $400\ \mu\text{m}$ .**

## **Danksagung**

Ich möchte mich herzlich bei Frau PD Dr. Dr. med. Spaniol für die Ermöglichung und Erstbetreuung dieser Dissertationsarbeit sowie die lehrreiche Unterstützung beim Überarbeitungsprozess dieser Monografie bedanken.

Frau Dr. rer. nat. Joana Witt möchte ich für die wissenschaftliche Einarbeitung und Mitwirkung sowie die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei aufkommenden Herausforderungen danken.

Herrn Prof. Dr. med. Geerling danke ich für die Ermöglichung meines Promotionsvorhabens sowie für die Möglichkeit zu regelmäßigen Fortschrittsberichten über das Projekt mit konstruktiven Ideen und Hinweisen.

Frau Prof. Dr. Dr. med. Caspers danke ich für die Co-Betreuung der Arbeit sowie die wertvollen Anregungen und Denkanstöße bei den regelmäßigen Fortschrittsgesprächen.

Vielen Dank an die Core Facility Elektronenmikroskopie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und insbesondere an Frau Dr. rer. nat. Bergmann für die gute Zusammenarbeit.

Großen Dank auch an das gesamte Laborteam, in dem stets ein harmonisches und freundschaftliches Zusammenarbeiten möglich war. Ich denke sehr gerne an diese Zeit zurück.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinem Freundeskreis für das offene Ohr und die stetige Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit.