

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

Untersuchungen zur Epithelialisierung, Biokompatibilität und -degradation von
Keratinfilmen nach Transplantation auf die Augenoberfläche in einem *in vivo*
Wundheilungsmodell

Dissertation

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

vorgelegt von

Patrick Bradenbrink

2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ. Prof. Dr. med. Gerd Geerling

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Friedrich Paulsen

Gewidmet: Marit Silke und Willem Tinus

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Borrelli M., Witt J., Roth M., Reichl S., Bradenbrink P., Schoppe M., Schrader S., Geerling G. 2022. Keratin films for ocular surface reconstruction: Wound healing in an in-vivo model *Experimental Eye Research*. 109356, 1-5.

Abstract

The most used method for ocular surface reconstruction to date is the transplantation of the human amniotic membrane (AM). However, there are disadvantages and risks associated with the use of AM that cannot be neglected and result in the need to establish a new type of material as an alternative to the AM. Well-known advantages of keratin films (KF) as implants compared to AM are their transparency, their almost unlimited availability, and their sterility. In this work, the transplantation of KF into the apical corneal stroma was performed for the first time in an *in vivo* rabbit model without the graft being covered by corneal stroma or epithelium postoperatively. The healing process was then clinically observed and evaluated in the first cohort at days 3, 7 and 10, in the second cohort at days 7, 14, 21 and 28, particularly regarding corneal epithelialization, transparency and neovascularization. At the end of the experiment, at day 10 or 28, the histological evaluation was carried out, with a special focus on epithelial closure and the inflammatory reaction of the corneal tissue. In the 10-day cohort, all eyes except one with AM showed a closed epithelium at the end of the experiment; none had a renewed epithelial defect after the corneal epithelium was completely closed once. After 28 days in the second cohort, 4 out of 5 animals with an AM had a non-closed epithelium; in the KF group it was 1 out of 5. The number of animals with epithelial defects in the AM group increased again from day 14 onward. In contrast to the AM group, from day 21, all corneas with transplanted KF showed a clear cornea without any reduction in transparency. No animal with a KF transplant showed neovascularization at the end of the experiment. Histologically, all corneas across groups showed a mild local inflammatory reaction with few inflammatory cells, mostly lymphocytes. The findings confirm previous experimental results, that a KF does not induce a strong inflammatory reaction in the corneal tissue and that transparency preserving KF transplantation is possible. In addition, the epithelialization of KF in the anterior stroma of the cornea and thus its support in the healing of corneal epithelial defects *in vivo* were demonstrated for the first time. Keratin films thus appear promising as a potential biomaterial for the reconstruction of the ocular surface.

Zusammenfassung

Das bisher am häufigsten verwendete Verfahren zur Augenoberflächenrekonstruktion ist die Transplantation der humanen Amnionmembran (AM). Es bestehen aber nicht zu vernachlässigende Nachteile und Risiken bei ihrer Verwendung, woraus der Bedarf entsteht, eine Alternative zur AM zu etablieren. Die bekannten Vorteile von keratinbasierten Biofilmen im Einsatz als korneale Implantate sind die Transparenz, die nahezu unbegrenzte Verfügbarkeit und die Sterilität. In dieser Arbeit wurde nun erstmals in einem *in vivo* Kaninchenmodell die Transplantation von Keratinfilm (KF) in die apikale Hornhaut durchgeführt, ohne dass das Transplantat postoperativ von Stroma oder Epithel gedeckt war. Im Anschluss erfolgte die Dokumentation des Heilungsprozesses, in der ersten Kohorte an den Tagen 3, 7 und 10, in der zweiten Kohorte an den Tagen 7, 14, 21 und 28, mit den Untersuchungsparametern Epithelialisierung, Transparenz und Neovaskularisationstendenz. Am Ende der Versuchsreihen erfolgte die histologische Aufarbeitung mit Fokus auf die Epithelialisierung und die Entzündungsreaktion des Hornhautgewebes. In der 10-Tage-Kohorte zeigten vier von fünf Augen mit einer AM bei Versuchsende ein geschlossenes Epithel, keines zeigte ein Defektrezidiv nach einmal vollständig geschlossenem Hornhautepithel. Nach 28 Tagen wiesen vier von fünf Tiere in der AM-Gruppe noch eine Epithelerosio auf, in der KF-Gruppe hingegen nur eines von fünf. Ab Tag 14 stieg die Anzahl der Tiere mit nicht geschlossenem Epithel in der AM-Gruppe bei Defektrezidiven erneut an.

Ab Tag 21 zeigt sich bei allen Hornhäuten der KF-Gruppe eine klare Hornhaut ohne Transparenzminderung. Neovaskularisationen konnten bei Versuchsabschluss bei keinem Tier mit einem KF nachgewiesen werden. Histologisch zeigten alle Augen gruppenübergreifend eine milde, lokale Entzündungsreaktion mit wenigen Entzündungszellen, zumeist Lymphozyten. Die Befunde bestätigen frühere Versuchsergebnisse mit KF und zeigen, dass KF im Hornhautgewebe keine starke Entzündungsreaktion induzieren und eine transparenzerhaltende KF-Transplantation möglich ist. Zusätzlich konnte nun erstmals die Epithelialisierung von KF und damit die Wundheilung von Hornhautepitheldefekten im *in vivo* Modell über einen KF hinweg nachgewiesen werden. KF scheinen damit als potenzielles Biomaterial für die Rekonstruktion der Augenoberfläche vielversprechend.

Abkürzungsverzeichnis

AM	Amnionmembran
°C	Grad Celsius
CLAU	Conjunctival Limbal Autograft
CLET	Cultivated Limbal Epithelial Transplantation
COMET	Cultivated Oral Mucosal Transplantation
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EGF	Epidermal Growth Factor
KF	Keratinfilm
KLAL	Keratolimbal Allograft
LSZI	limbale Stammstellinsuffizienz
M	Mol
Mio.	Millionen
nm	Nanometer
NaOH	Natriumhydroxidlösung
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
SE	Shindai Extract
SLET	Simple Limbal Epithelial Transplantation

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DIE AUGENoberFLÄCHE	1
1.2	DIE LIDER	1
1.3	DIE BINDEHAUT	1
1.4	DER TRÄNENFILM UND DAS TRÄNENBILDENDE SYSTEM	2
1.5	DIE HORNHAUT (KORNEA)	3
1.5.1	<i>Ernährung, Immunprivileg und Innervation</i>	3
1.5.2	<i>Die Anatomie der Hornhaut</i>	5
1.5.3	<i>Der Limbus und die Regenerationsmöglichkeiten der Hornhaut</i>	9
1.6	PATHOLOGIEEN DER AUGENoberFLÄCHE	11
1.6.1	<i>Die limbale Stammzellinsuffizienz (LSZI)</i>	11
1.6.2	<i>Ursachen der limbalen Stammzellinsuffizienz</i>	11
1.6.3	<i>Klinik der limbalen Stammzellinsuffizienz</i>	13
1.7	TRANSPLANTATIONEN ZUR REKONSTRUKTION DER AUGENoberFLÄCHE	14
1.7.1	<i>Transplantationschirurgie der Hornhaut</i>	14
1.7.2	<i>Transplantationschirurgie des Limbus</i>	15
1.7.3	<i>Transplantationschirurgie der Amnionmembran</i>	18
1.7.4	<i>Keratin als Alternative zur Rekonstruktion der Augenoberfläche</i>	20
1.8	FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT	22
2	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1	HERSTELLUNG DER KERATINFILME	23
2.2	DIE AMNIONMEMBRAN	24
2.3	DAS TIERMODELL	25
2.4	DIE OPERATION	25
2.5	VERLAUF UND GRUPPEN	28
2.6	HISTOLOGIE	31
2.7	DATENAUSWERTUNG	34
3	ERGEBNISSE	35
3.1	KLINISCHE ERGEBNISSE	35
3.1.1	<i>Epitheldefekt</i>	35
3.1.2	<i>Neovaskularisation</i>	37
3.1.3	<i>Transparenz</i>	38
3.1.4	<i>Hornhautscore</i>	41
3.2	INFLAMMATION IN DER HISTOLOGIE	44
3.3	EPITHELIALISIERUNG DER KERATINFILME	45

4	DISKUSSION	47
4.1	LIMITATION DER AMNIONMEMBRAN	47
4.2	ANDERE MATERIALIEN ZUR REKONSTRUKTION DER AUGENoberFLÄCHE	49
4.3	KERATIN, EIN UNIVERSELLES BIOMATERIAL?	51
4.4	GRUNDLAGE DES ERFOLGES – DIE EIGENSCHAFTEN DES KERATINS ALS BIOMATERIAL	52
4.5	KERATINFILME FÜR DIE REKONSTRUKTION DER AUGENoberFLÄCHE	54
4.6	EINSCHRÄNKUNGEN DIESER ARBEIT	57
4.7	SCHLUSSFOLGERUNGEN	58
5	LITERATURVERZEICHNIS	59

1 Einleitung

1.1 Die Augenoberfläche

Die anatomischen Strukturen der Lider, der Bindehaut, sowie des tränenbildenden Systems und die Hornhaut bilden als System der Augenoberfläche eine funktionelle Einheit (1). Gekennzeichnet durch ein kontinuierliches Epithel dient das System der Augenoberfläche dem Schutz der Integrität seiner Komponenten (2). Für ein gutes Sehvermögen ist diese Integrität essenziell. Sie muss trotz der permanenten und unmittelbaren chemischen, physikalischen und immunologischen Umwelteinflüsse aufrechterhalten werden (3).

1.2 Die Lider

Die Lider dienen als anatomische Struktur dem Schutz des Auges und befeuchten durch den regelmäßigen Lidschlag die Augenoberfläche. Im Schlaf muss die Lidspalte verschlossen sein, um eine Austrocknung der Schleimhäute des Auges zu verhindern. Im Wachzustand reguliert die Größe der Lidspalte den Lichteinfall. Etwa zehn Mal pro Minute erfolgt der unwillkürliche Lidschlag, er verteilt den Tränenfilm auf der Augenoberfläche und hilft beim Abtransport von abgeschilferten Eigen- sowie Fremdmaterial. Bei Reizung des Nervus trigeminus wird der reflektorische Lidschluss über einen Reflexbogen mit dem Nervus facialis ausgelöst. Dabei kontrahiert der Musculus orbicularis oculi, während gleichzeitig der Musculus levator palpebrae gehemmt wird (4).

1.3 Die Bindehaut

Die durchsichtige Bindehaut besteht aus einem mehrschichtigen Zylinderepithel mit Bindegewebe. Sie ist im Bereich des Limbus, der Grenze zwischen Bindehaut und Hornhaut, fest mit dem Bulbus verwachsen. Von dort ausgehend ist die Bindehaut zunächst auf der Sklera frei verschiebbar. Nach superior und inferior bildet die Bindehaut eine Umschlagfalte, die sogenannte Fornix Conjunctivae. Sie geht schließlich in die Conjunctiva tarsi über, welche fest an der Innenseite des Ober- und Unterlides mit dem Tarsus verwachsen ist.

Im Epithel sind zahlreiche Becherzellen verteilt, welche zusammen mit den Epithelzellen der Hornhaut und Bindehaut den mukösen Anteil des Tränenfilmes bilden (s.u.). Daneben finden sich in der Bindehaut die Krause-Drüsen, welche mit den Wolfringdrüsen die akzessorischen Tränendrüsen bilden und zur wässrigen Befeuchtung der Augenoberfläche beitragen. Die feuchte, glatte Schleimhautoberfläche in Kombination mit dem Tränenfilm lässt den Bulbus bei Augenbewegungen nahezu reibungsfrei gleiten. Die Bindehaut spielt auch bei immunologischen Prozessen der Augenoberfläche eine wichtige Rolle. Im subepithelialen Bindegewebe finden sich Lymphozytenansammlungen und die Zellen der Bindehaut sezernieren bakterizide Substanzen, Immunglobuline, Interferone und Prostaglandine (4).

1.4 Der Tränenfilm und das tränenbildende System

Der Tränenfilm bildet die Grenzfläche zwischen der Konjunktiva, der Hornhaut und der Umwelt; seine Dicke beträgt circa 3 μm (5). Der Tränenfilm setzt sich aus der äußeren Lipidschicht und einer nach innen kontinuierlich muköser werdenden wässrig-mukösen Schicht zusammen. Die Lipidschicht wird von den Meibomdrüsen, die wässrigen Bestandteile von der Haupttränendrüse und den akzessorischen Tränendrüsen produziert. Die Muzine entstammen größtenteils den Becherzellen der Bindehaut (sezernierte Muzine wie MUC5AC), aber auch den Epithelzellen der Bindehaut und Hornhaut (membrangebundene Muzine wie das MUC1, MUC4 und MUC16) (4,6).

Die Muzine ermöglichen die gleichmäßige Verteilung der wässrigen Phase über das Epithel, sorgen für die nötige Haftung des Tränenfilmes und reduzieren beim Lidschlag Mikrotraumata des Epithels durch Scherkräfte. Die wässrige Phase bildet den größten Anteil des Tränenfilmes, sie erschafft das optimale Milieu für die Epithelzellen. Hier findet der Transport von Nährstoffen und Sauerstoff in Richtung Hornhautgewebe statt, aber auch der Abtransport von Epithelabschilferungen sowie Gift- und Fremdstoffen. Die außen gelegene Lipidschicht dient in erster Linie der Reduzierung der Verdunstung des Tränenfilmes, sie stabilisiert und glättet den Tränenfilm zusätzlich (7).

Der komplexe Aufbau des Tränenfilmes dient seiner wichtigen Aufgabenerfüllung als vorderster Bestandteil der Augenoberfläche. Die Instandhaltung der Stabilität

des Tränenfilmes ist dabei entscheidend für die optische Qualität der Augenoberfläche und damit für die Sehschärfe. Ein instabiler Tränenfilm führt zu Unebenheiten der Hornhaut und zu reduziertem Kontrastsehen bei deutlich mehr optischen Aberrationen (8,9).

Der Tränenfilm unterstützt die alltägliche Regeneration der Hornhaut und fördert, wenn nötig, die Wundheilung über eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren (10). Er wirkt antiinfektiv durch eine Vielzahl an enthaltenen Molekülen wie dem antibakteriell wirkenden Lysozym und dem Lactoferrin (11,12).

1.5 Die Hornhaut (Kornea)

Die Hornhaut hat durch ihre vordere, zentrale Lage in der optischen Achse mit ihrer transparenten und lichtbrechenden Struktur eine Schlüsselrolle beim Schutz des Auges und beim Sehvorgang inne (13).

Die gesunde Hornhaut eines Erwachsenen hat im Durchschnitt einen Durchmesser von 11,5 bis 12 mm (14). Die Dicke der Hornhaut beträgt durchschnittlich 550 µm und nimmt von 500 µm zentral nach peripher auf ca. 700 µm zu (4). Die Hornhaut wölbt sich nach vorne und ist stärker gekrümmt als die Sklera, sodass sie in diese wie ein Uhrglas in das Uhrgehäuse eingelassen wirkt. Durch die spezielle Form mit steilerem Zentrum und flacherer Peripherie entsteht ein asphärisches optisches System (15). Die Brechkraft der Hornhaut beträgt ca. 43 dpt. und macht damit näherungsweise dreiviertel der Brechkraft des Auges aus. Dieser hohe Wert entsteht neben der Wölbung durch die unterschiedlichen Brechungsindizes zwischen Luft (ca. 1,0) und Hornhaut (ca. 1,33) (4).

1.5.1 Ernährung, Immunprivileg und Innervation

Um die Transparenz zu gewährleisten, kann die gesunde Hornhaut keine Gefäße enthalten und muss einen relativ geringen Wassergehalt aufweisen. Das Fehlen jeglicher Blut- und Lymphgefäße führt zu Besonderheiten des Gewebes in Bezug auf die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff. Es wird daher vom Randschlingennetz der Bindehautgefäße und von innen über das Kammerwasser ernährt. Von anterior können Nährstoffe und Sauerstoff über den Tränenfilm sowie zusätzlicher Sauerstoff aus der Luft in das Gewebe gelangen (4). Zweiseitig von Flüssigkeiten umgeben, die für die Nährstoffversorgung essenziell sind, besitzt die

Hornhaut einen speziellen anatomischen Aufbau (s. Abb. 1), welcher ihr trotzdem erlaubt, selbst relativ dehydriert zu bleiben.

Die Hornhaut besitzt ein Immunprivileg und durch die fehlende direkte Gefäßversorgung eine immunologische Sonderstellung (16). Anders als andere Gewebe, reagiert die Hornhaut bei Verletzungen unter normalen Umständen nicht mit der Induktion von Blut- oder Lymphgefäßbildung. Das Einwachsen der Gefäße würde die Transparenz gefährden und damit die Funktion der Hornhaut. Dieses Immunprivileg ist daher für eine gute Sehkraft essenziell und wird strikt und redundant über eine Vielzahl an anti-angiogenen Molekülen reguliert. Nur im Falle schwerer Infektionen oder anderer potenziell das gesamte Auge gefährdender Situationen kann es zu einer so heftigen und angiogenen Immunreaktion kommen, welche die Transparenz der Hornhaut gänzlich außer Acht lässt und einzig dem Erhalt des Auges dient (17).

Die sensible Innervation erfolgt über frei endende Nervenfasern aus dem Nervus ophthalmicus, dem ersten Ast des Nervus trigeminus (4). Sie ist so ausgeprägt, dass es sich bei der Hornhaut um das am dichtesten innervierte Gewebe des menschlichen Körpers handelt (18). Die Nerven verlaufen strahlenförmig nach vorne und ziehen zentral durch die Hornhautmitte im Stroma. Sie geben Äste zur Innervation des vorderen und mittleren Stromas ab. Unterhalb der Bowmanmembran im vorderen Stroma bildet sich ein erster Nervenplexus, dessen Äste die Bowmanmembran durchbrechen, um einen weiteren Plexus direkt unterhalb des Epithels zu bilden. Von dort erfolgt die Innervation der Epithelzellen mit Nervenenden, die bis zu den superfiziellen Plattenepithelzellen reichen (19). Die dichte Innervation ist ein entscheidender Faktor für ein gesundes und intaktes Hornhautepithel. Die Nerven stellen über das regelmäßige Blinzeln eine ausreichende Benetzung des Epithels und die Abschilferung alter Epithelzellen sicher. Sie bilden zusätzliche wichtige epitheliotrope Substanzen. Eine Degeneration der sensiblen Innervation der Hornhaut geht daher mit chronischen Wundheilungsstörungen des Epithels oder sogar persistierenden Ulzerationen im Hornhautgewebe einher. Diese neurotrophen Keratopathien können zu sehbedrohenden Komplikationen wie schweren Infektionen und einer Perforation der Hornhaut führen (17).

1.5.2 Die Anatomie der Hornhaut

Das Epithel entstammt dem Ektoderm, das Stroma leitet sich vom Mesoderm ab und das Endothel entwickelt sich aus der Neuralleiste (20).

Der histologische Aufbau der menschlichen Hornhaut besteht aus 5 Schichten, 3 zellulären (Epithel, Stroma, Endothel) und 2 verbindenden Schichten (Bowman-, Descemetmembran) (15). Von außen nach innen sind die Schichten in folgender Reihenfolge angeordnet: Epithel, Bowmanmembran, Stroma, Descemetmembran, Endothel (s. Abb.1).

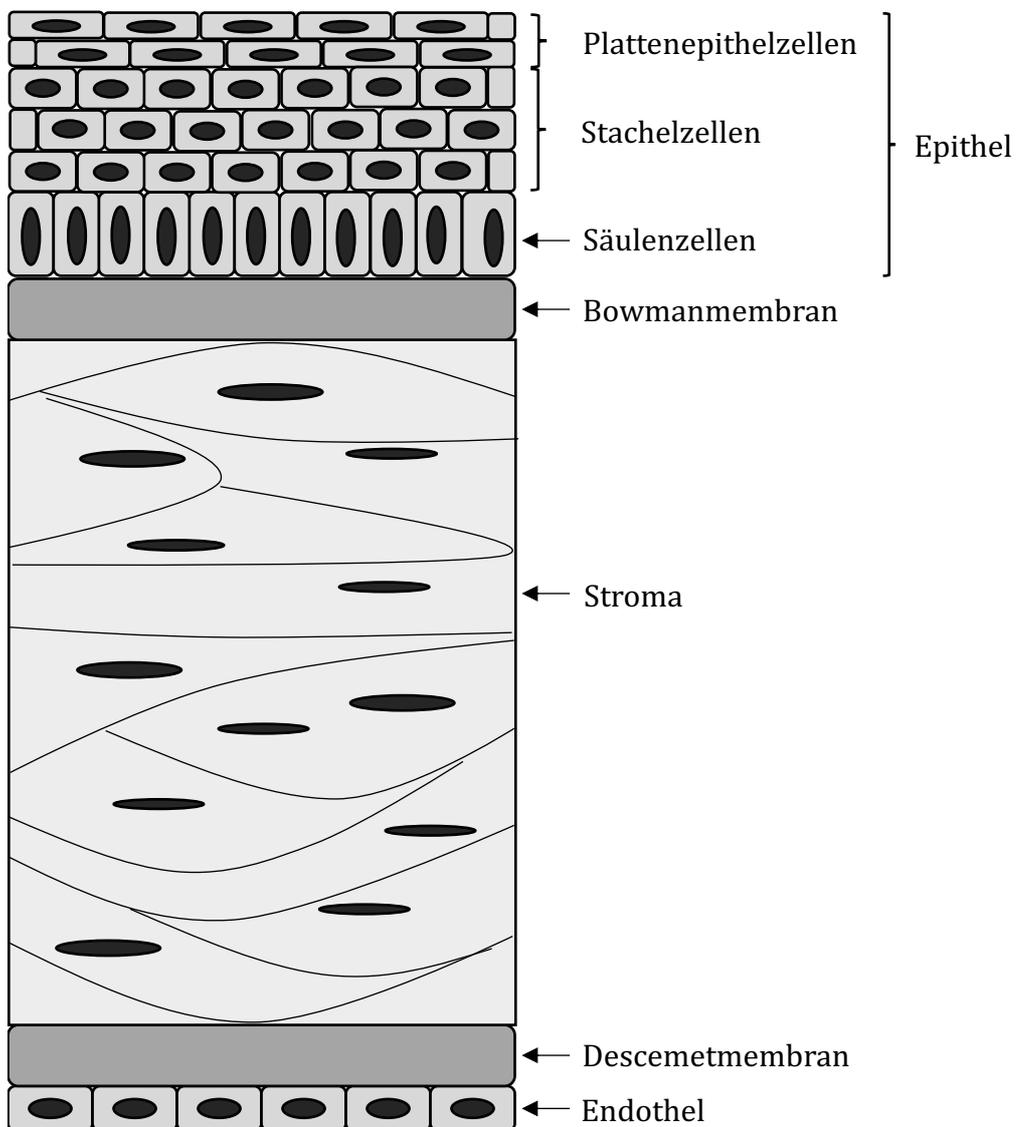


Abb. 1: Anatomie der Hornhaut

1.5.2.1 Das Epithel

Das Epithel ist ein unverhorntes mehrschichtiges Plattenepithel und besteht aus drei unterschiedlichen Zelllagen. Die innen gelegenen Basalzellen bilden eine einfache Lage Säulenzellen und sind u.a. über Hemidesmosomen fest mit der Basalmembran und dem darunter liegenden Stroma verbunden (21). Danach folgen in der Mitte zwei oder drei Reihen Stachelzellen. Außen befinden sich zwei Reihen Plattenepithelzellen (s. Abb. 1).

Das Epithel bildet als äußerste Schicht der Hornhaut die Barriere zur Umwelt, es schützt vor dem Eindringen pathogener Erreger und anderer Fremdstoffe. Die dichte Barriere hilft dabei, den relativ geringen Wasseranteil des Gewebes trotz des direkten Kontaktes zum Tränenfilm aufrechtzuerhalten (20). Die Plattenepithelzellen bilden Mikrofalten und Mikrovilli aus, um den Tränenfilm zu stabilisieren und unterstützen so die klare und glatte Augenoberfläche (18).

1.5.2.2 Die Bowmanmembran

Die darunterliegende Bowmanmembran ist eine azelluläre Schicht des Stromas. Die Kollagenfasern sind in diesem Bereich um bis zu 50 % kleiner als im restlichen Teil des Stromas (22). Anders als im darunter liegenden Gewebe sind die Kollagenfibrillen nicht geordnet und bilden eine filzartige Platte (23).

Die Funktion der Bowmanmembran ist nicht abschließend geklärt. Sie könnte eine Rolle beim Schutz des vorderen Nervenplexus der Hornhaut spielen (20). Wilson und Hong stellten 2000 die Hypothese auf, dass die Bowmanmembran als Grenzschicht zwischen Epithel und dem restlichen Stroma fungiert. Demnach bilden die Epithelzellen Interleukine, welche die Migration der Keratozyten zu weit nach anterior verhindern, um so eine Störung der Epithelphysiologie zu vermeiden (24). Seit dem Einzug der phototherapeutischen Keratektomie in den klinischen Alltag der Augenheilkunde wurde die Bowmanmembran bei vielen Millionen Menschen im zentralen Bereich der Hornhaut entfernt. Dies geschah ohne Abnahme der Sehschärfe oder relevante strukturelle Veränderung der restlichen Hornhaut (20,24).

1.5.2.3 Das Stroma

Das Stroma bildet bis zu 90% des Hornhautgewebes, es besteht überwiegend aus Lamellen, welche aus parallel angeordneten Kollagenfibrillen bestehen. Die Fibrillen werden von dicht gepackten Kollagenfasern vorwiegend vom Kollagen Typ I und V gebildet. Die Lamellen sind schichtweise angeordnet, die Fibrillen unterschiedlicher Lagen stehen im rechten Winkel zueinander. Hinzu kommen die Keratozyten und weitere Bestandteile der Extrazellulärmatrix wie Wasser, anorganische Salze, Glykoproteine und Proteoglykane (19,25).

Die Größe des Durchmessers der einzelnen Kollagenfibrillen wird durch die Anzahl an Verbindungen der Kollagenmoleküle untereinander bestimmt. Die speziellen Proteoglykane (Decorin, Lumican, Keratocan, Mimecan) im Stroma steuern und begrenzen die Anlagerung von Kollagenmolekülen aneinander und limitieren auf diese Weise das Wachstum der Fibrille. Mit ihrer kleinen einheitlichen Größe sorgen die Glykoproteine (Chondroitinsulfat, Keratansulfat, Heparansulfat) für gleichmäßige Abstände zwischen den fertigen Kollagenfibrillen, indem sie über ihre leucinreichen Strukturen mit dem Kollagen interagieren (25).

Zusammen bildet dies eine regelmäßig angeordnete netzartige Struktur, welche der Hornhaut ihre Festigkeit und Lichtdurchlässigkeit verleiht (15,26).

Die Keratozyten sind die Hauptzellen des Stromas und für die Aufrechterhaltung der gesamten extrazellulären Matrix verantwortlich. Sie sind in der Lage Kollagen und alle weiteren für die Homöostase des Stromas wichtigen Moleküle bereitzustellen. Die Keratozyten haben einen kompakten Zellkörper mit kleiner Oberfläche und enthalten in ihrem Zytoplasma bis zu 30 % kristalline Proteine, um mögliche Lichtstreuung zu reduzieren (25).

1.5.2.4 Die Descemetmembran

Die Descemetmembran ist die Basalmembran der Endothelzellen der Hornhaut und besteht aus einer dichten, zellfreien und transparenten Matrix (27). Die Dicke der Descemetmembran beträgt im Kindesalter ca. 3 μm und nimmt im Laufe des Lebens zu. Im Erwachsenenalter hat sich die Dicke ungefähr verdreifacht und beträgt 8-10 μm . Damit ist sie die dickste Basalmembran des menschlichen Körpers.

Die Descemetmembran besteht aus einer anterioren, an das Stroma gebundenen Schicht und einer posterior liegenden, ungebundenen Schicht. Der anteriore Teil besteht aus Kollagenen vom Typ IV und VIII und Proteoglykanen, die der Descemetmembran eine hohe Elastizität und Widerstandsfähigkeit verleihen. Dieser Teil ist bereits beim Fetus ab der 12. Gestationswoche nachweisbar und die Entwicklung ist bei der Geburt abgeschlossen. Der posteriore Anteil besteht aus einer homogenen Matrix, die von den Endothelzellen im Laufe des Lebens kontinuierlich gebildet wird und zur stetigen Dickenzunahme der Descemetmembran führt (20). Die Descemetmembran schützt das Endothel und verankert die Endothelzellen am posterioren Stroma. Der Einstrom von Wasser in das Stroma wird durch die Descemetmembran verhindert, während sie gleichzeitig Nährstoffe passieren lässt. Damit ist die Descemetmembran entscheidend für die Dehydratation des Stromas durch das Endothel und folglich für die Transparenz der Hornhaut (27).

1.5.2.5 Das Endothel

Das einschichtige Endothel besteht aus einer Lage hauptsächlich hexagonaler, teils polygonaler Zellen. Es bildet die Rückfläche der Hornhaut zum Kammerwasser und reguliert die Stoffwechselprozesse zwischen Stroma und Kammerwasser. Zellteilung findet hier nur in den ersten Lebensmonaten statt. Die Zellzahl beträgt bei der Geburt ca. 6000 pro mm^2 und nimmt jährlich um ca. 0.6 % ab (17,18). Das Endothel ist die entscheidende Schicht der Hornhaut zur Regulation des Wasseranteils des Gewebes. Der geringe Wasseranteil der Hornhaut im Vergleich zu den sie umgebenden Strukturen wird vom Endothel aktiv über eine Ionenpumpfunktion und passiv über Zonulae occludentes aufrechterhalten. Der Prozess der Dehydratation erfolgt mithilfe der Natrium-Kalium ATPase und der Bikarbonat-abhängigen Magnesium ATPase (20).

Funktionsstörungen des Endothels, beispielsweise durch Verletzungen oder eine Endothelinsuffizienz bedingt durch eine zu geringe Zellzahl (unter 500-800 pro mm^2), führen zu einer zunehmenden Hydratation des Stromas. Vor allem eindringendes Kammerwasser führt dann über eine Quellung des Stromas zur Eintrübung der Hornhaut inklusive einer Abnahme der Sehschärfe (4).

1.5.3 Der Limbus und die Regenerationsmöglichkeiten der Hornhaut

Alle Schichten der Hornhaut müssen im Bedarfsfall auf eine Störung ihrer Integrität reagieren. Die Zellen des Epithels, das Stroma und das Endothel reagieren dabei sehr unterschiedlich.

1.5.3.1 Epithelregeneration

Das Epithel als vorderste zelluläre Schicht der Augenoberfläche ist durch seine Lage anfällig für Verletzungen, es besitzt dementsprechend das notwendige, hohe Regenerationspotential (17). Bereits unter physiologischen Bedingungen werden die Plattenepithelzellen nach einer Lebenszeit von ca. einer Woche abgeschilfert und gelangen in den Tränenfilm (28). Für die Erneuerung beherbergt die Basalzellschicht des Epithels in den Vogt-Palisaden des Limbus eine Stammzellpopulation als Reservoir (s. Abb. 2) (29,30). Durch asymmetrische Teilung entstehen aus diesen Stammzellen Vorläuferzellen, ohne das Reservoir an Stammzellen zu erschöpfen. Die Zellen wandern zentripetal über die Hornhaut zum Zentrum (s. Abb. 2 B). Während dieser Migration differenzieren die Vorläuferzellen zunächst zu postmitotischen Zellen und abschließend zu Epithelzellen, um so die Zellschichten des Epithels zu erneuern (31).

Eine schnelle Epithelregenerierung ist notwendig, um Komplikationen wie Infektionen von tiefergelegenen Schichten der Hornhaut und dem restlichen Auge abzuwenden. Kleinere Epitheldefekte sind in der Regel innerhalb von 24 h verheilt. Eine komplexe Komposition aus Wachstumsfaktoren koordiniert den Heilungsprozess. Im Falle eines Epitheldefektes beginnt umgehend vom Wundrand ausgehend die Abflachung der Zellen sowie eine zentripetale Zellmigration. Anschließend erfolgt die Differenzierung und Proliferation der Basalzellen, um die Zellschichten zu erneuern (17).

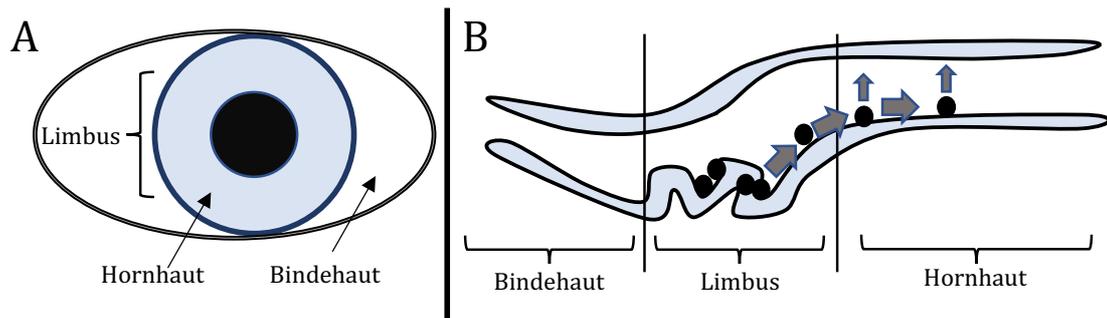


Abb. 2: **Anatomie des Limbus** A: Die Stammzellen befinden sich am Übergang zwischen Hornhaut und Bindehaut im Bereich des Limbus. B: Lage der Stammzellen in den Vogt-Palisaden im Bereich des Limbus und Darstellung der zentripetalen Migration zur Regeneration des Hornhautepithels.

1.5.3.2 Stromaregeneration

Während die zellulären Bestandteile des Stromas gut ersetzt werden können, besteht die Herausforderung bei der Wiederherstellung des stromalen Gewebes in der Reorganisation der regelmäßigen Kollagenstruktur (17). Häufig wird dieser Prozess von Narbenbildung und damit der Eintrübung der betroffenen Hornhautregion begleitet. Denn während der Wundheilung des Stromas kann das Volumen an benötigter Extrazellulärmatrix nicht nur durch die wenigen Keratozyten gebildet werden. Ist die Verletzung tief genug, um die Struktur und Funktion der epithelialen Basalmembran zu beeinträchtigen, können u.a. Botenstoffe wie PDGF (*platelet-derived growth factor*) und TGF- β (*transforming growth factor beta*) vom Epithel ausgehend in das Stroma gelangen. Diese führen dort zur Expression von Myofibroblasten, welche große Mengen unorganisierter Extrazellulärmatrix produzieren. Der auf diese Weise ermöglichte schnellere Wundverschluss geht mit einem Verlust an Transparenz einher (19).

1.5.3.3 Endothelregeneration

Im Vergleich aller Schichten der Hornhaut besitzt das Endothel die geringste Teilungsaktivität und damit auch die geringste Regenerationsfähigkeit. Bei Zellverlusten in kleinen Bereichen können die Endothelzellen sich ausdehnen und migrieren, um die einschichtige Zellschicht wieder zu verschließen. Erkrankungen oder Verletzungen, die zu einer deutlichen Reduktion der Zellzahl des Endothels führen, können aber nicht kompensiert werden. Wie schon zuvor beschrieben (s.o.)

kommt es bei Funktionsverlust des Endothels zu dramatischen Folgen für die Sehkraft durch ein quellendes Hornhautgewebe mit Opazität (17,32).

1.6 Pathologien der Augenoberfläche

Augenoberflächenerkrankungen sind eine heterogene Gruppe unterschiedlichster Krankheitsentitäten, deren Gemeinsamkeit in der Lokalisation ihrer Manifestation liegt. Sie können sich daher in ihrer Ätiologie, dem Verlauf, der Prognose und den Therapieoptionen deutlich unterscheiden.

Angeborene, degenerative, infektiöse, neoplastische, autoimmune und trophische Erkrankungen können ebenso wie traumatische Ereignisse zu einem akuten oder chronischen Zusammenbruch der Augenoberflächenintegrität führen. Die Symptome können von leichten Missempfindungen bis zu starken Schmerzen reichen. Das Spektrum der Transparenzreduktion der Hornhaut und damit der Verlust an Sehkraft reicht von nahezu unbeeinträchtigt über massiv ausgeprägt bis hin zur hornhautbedingten Erblindung (1).

1.6.1 Die limbale Stammzellinsuffizienz (LSZI)

Für viele Augenoberflächenerkrankungen, wie dem häufigen trockenen Auge, sind zahlreiche und gute Therapiemöglichkeiten bekannt. Kommt es aber im Rahmen von besonders schweren oder chronischen Erkrankungen der Augenoberfläche zur Reduktion der Stammzellpopulation des Limbus, der sogenannten LSZI, ist die Behandlung noch immer herausfordernd (33,34).

1.6.2 Ursachen der limbalen Stammzellinsuffizienz

Beispiele von Erkrankungen, die zu einer schweren Augenoberflächenstörung führen können und auch zur LSZI, sind das Stevens-Johnson-Syndrom und die toxische epidermale Nekrolyse, das okuläre Schleimhautpemphigoid, die Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (*Graft-versus-Host-Disease*, *GvHD*) und Traumata, wie chemische oder thermische Verletzungen, Lidanomalien, wie das Entropium oder die Trichiasis, schwere Formen des trockenen Auges und der neurotrophen Kerathopathie (35). Letztere entsteht am häufigsten als Folge einer herpetischen oder diabetischen Schädigung des Nervus trigeminus. Besonders langanhaltende und heftige Entzündungsintervalle im Rahmen der genannten

Erkrankungen führen zu einer Reduktion der limbalen Stammzellpopulation und konsekutiv zur LSZI (17,36,37).

Diese heterogene Gruppe, deren Gemeinsamkeit die massive Schädigung der limbalen Stammzellen und ihrer Nische ist, führt zum Verlust der Regenerationsmöglichkeit des Hornhautepithels (38,39). Angeborene Ursachen für eine LSZI sind selten und im Allgemeinen mit einer Aniridie vergesellschaftet. Deutlich häufiger ist die Ursache für die Insuffizienz erworben, sie entsteht am häufigsten im Rahmen von Unfällen wie chemischen oder thermischen Verletzungen (75 %). Wie zuvor erwähnt können zahlreiche schwere Erkrankungen der Augenoberfläche eine LSZI zur Folge haben. Besondere Relevanz als zweit häufigste Ursache haben die zwei okulomukokutanen Syndrome, das Stevens-Johnson-Syndrom bzw. die toxische epidermale Nekrolyse und das okuläre Pemphigoid mit einem gemeinsamen Anteil von ca. 8 % (40). Bei beiden Erkrankungen kommt es häufig zu besonders schweren Augenoberflächenerkrankungen, da sie eine Kombination aus starker Inflammation, Tränenfilmverlust und Bindehautvernarbung zur Folge haben (41). Die lang anhaltende Inflammation führt zur Schädigung mit folgender Ausdünnung der limbalen Stammzellpopulation (37).

Beim Stevens-Johnson-Syndrom und ebenso bei der schwereren Verlaufsform der toxischen epidermalen Nekrolyse handelt es sich um eine zellvermittelte verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion meist gegenüber Medikamenten oder Erregern. Da sich die Symptome oft erst Wochen nach der Exposition ausbilden, ist das Identifizieren des Auslösers schwierig und meist erfolglos. Zu den akuten ophthalmologischen Befunden gehört eine ausgeprägte Blepharitis, eine papilläre Konjunktivitis unter Ausbildung von Membranen und Pseudomembranen sowie eine erosive Keratitis. Später entwickeln sich dann Bindehautvernarbungen mit Fornixverkürzungen und einem daraus resultierenden Symblepharon. Es kommt zu schweren Lidkomplikationen wie dem Narbentropium und -ektropium, einer Trichiasis und dem Ankyloblepharon. Die Entzündungsreaktion und das Narbentropium mit den fehlstehenden Wimpern führen zu einer schweren Keratopathie mit Vernarbungen und einer Vaskularisierung.

Beim Schleimhautpemphigoid oder dem vernarbenden okulären Pemphigoid kommt es zu mukokutaner Blasenbildung. Eine zytotoxische Typ-II-

Überempfindlichkeitsreaktion unbekannter Genese führt zur Antikörperbindung an der Basalmembran mit konsekutiver autoimmun verursachter Ablösung von Epithelien und anschließender fortschreitender Vernarbung. Das okulär vernarbende Pemphigoid betrifft meist die Konjunktiva und verursacht eine papilläre Konjunktivitis mit Fibrose. Es führt zu Symblephara und durch Zerstörung der Becherzellen und der akzessorischen Tränendrüsen in Kombination mit einem Verschluss der großen Tränendrüsenänge zur Austrocknung der Augenoberfläche. Epitheldefekte, Infiltrationen und eine Neovaskularisierung der Hornhaut sind die Folge (18).

Seltener kann die limbale Stammzellpopulation iatrogen durch wiederholte chirurgische Eingriffe, Kryo- oder Bestrahlungstherapie im Rahmen anderer Augenerkrankungen induziert werden. Mechanische, toxische und entzündliche Faktoren in Kombination mit einer Hypoxie können zur Schädigung der limbalen Stammzellen beim Tragen von Kontaktlinsen führen.

1.6.3 Klinik der limbalen Stammzellinsuffizienz

Je nach Ausmaß der Schädigung des Limbus wird zwischen einer partiellen Insuffizienz mit sektoriellem Verlust der Stammzellpopulation und einer totalen, zirkulären LSZI unterschieden (38,42).

Stets kommt es durch die Schädigung des Limbus zur Aufhebung der Barriere zwischen Bindehaut und Hornhaut (43). Der Ersatz kornealen Epithels durch Zellen der Bindehaut begleitet von sekundären Neovaskularisationen wird als Konjunktivalisierung bezeichnet und ist pathognomonisch für die LSZI (38). Der Nachweis von für die Bindehaut typischen Becherzellen im Hornhautepithel gilt daher als sicherstes Zeichen für die Diagnose (44). Das neu gebildete, irreguläre Epithel besitzt nur lockere Interzellulärverbindungen (45). Dies führt zu persistierenden Erosionen, stromalen Ulzerationen und Vernarbungen. Der Verlust an löslichen VEGF-Rezeptoren (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*, Endothelwachstumsfaktor-Rezeptor) im neuen Epithel führt zu Neovaskularisationen über den Limbus hinaus (46).

Es resultieren chronische Schmerzen und ein Sehverlust. Die permanente Gefahr einer das gesamte Auge bedrohenden Sekundärinfektion und einer Perforation besteht (38,41).

1.7 Transplantationen zur Rekonstruktion der Augenoberfläche

Da konservative Therapieansätze häufig nicht ausreichen, um eine adäquate Rekonstruktion der Augenoberfläche erzielen zu können, sind mikrochirurgische Eingriffe wie Transplantationen das Mittel der Wahl, um schwere Augenoberflächenerkrankungen zu stabilisieren (33,36).

Das Management schwerer Augenoberflächenerkrankungen hat sich dabei in den letzten Jahrzehnten drastisch verändert. Noch in den 1970er Jahren war die Prognose für Patienten mit schwer erkrankten Augenoberflächen stets schlecht (41). Die Lage der Stammzellen im Bereich des Limbus und ihre entscheidende Funktion bei der Wiederherstellung des Hornhautepithels wurde erstmals 1971 postuliert und brachte einen Paradigmenwechsel in der Behandlung von schweren Augenoberflächenerkrankungen (29). Ein weiterer Durchbruch war die operative Verwendung von menschlicher AM als Basalmembranersatz sowie als Patch zum temporären Schutz der Augenoberfläche (33,47).

Ziel der Rekonstruktion ist die Wiederherstellung eines stabilen Zustandes der Augenoberfläche. Der operative Eingriff soll folglich das Risiko für Defekte und deren Komplikationen wie Ulzerationen, Infektionen und Perforationen so weit wie möglich reduzieren. Primäres Ziel der Rehabilitation der Augenoberfläche ist daher eine möglichst konstante Oberflächenintegrität, nur selten kann eine zeitnahe Visusverbesserung realisiert werden. Bei guter Rekonstruktionsmöglichkeit kann gleichzeitig oder später eine Hornhauttransplantation erwogen werden (3,33).

1.7.1 Transplantationschirurgie der Hornhaut

Die erste erfolgreiche Hornhauttransplantation wurde bereits 1906 durchgeführt. Seitdem hat sich das Verfahren deutlich weiter entwickelt und gerade in den letzten Jahren fand ein rasanter Wandel hin zu lamellären Transplantationsverfahren statt (48–50). Neben der perforierenden Keratoplastik, bei der die Hornhaut über alle Gewebeschichten hinweg durch Spendergewebe ersetzt wird, sind heute durch verbesserte Dissektionstechniken zahlreiche Varianten von lamellären Hornhauttransplantationen möglich (51). Diese Techniken zum Ersatz nur der inneren oder äußeren Hornhautschichten haben in jüngster Vergangenheit die perforierende Keratoplastik immer mehr ersetzt (52). Bei Endothelerkrankungen,

wie der Fuchs-Endotheldystrophie, haben Hornhautteiltransplantationen, wie die *Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty* (DSAEK) und die *Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty* (DMEK), an Bedeutung und damit an Anzahl der durchgeführten Operationen enorm zugenommen und sind heute der Goldstandard der Therapie (52,53). Liegt die Erkrankung im Bereich der vorderen Hornhaut, beispielsweise im vorderen Stroma bei einem Patienten mit Keratokonus, so hat sich die tiefe anteriore lamelläre Keratoplastik (*Deep Anterior Lamellar Keratoplasty*, DALK) als sicheres Verfahren mit geringerem Risikoprofil gegenüber der perforierende Transplantation etabliert (54). Die Möglichkeit eines weniger invasiven Vorgehens und das gezielte Adressieren der erkrankten Hornhautschicht durch die Operation, haben je nach Erkrankung und Verfahren zu besseren Ergebnissen hinsichtlich des Astigmatismus, der Hornhautstabilität, der Rehabilitationszeit und zu weniger immunologischen Prozessen wie Abstoßungsreaktionen geführt (49). Trotz dieser enormen Erfolge und Verbesserungen in der Transplantationstechnik bleibt kein Zweifel daran bestehen, dass eine alleinige Hornhauttransplantation mit Spendergewebe beim Patienten mit manifester LSZI kontraindiziert ist. Erst in Kombination mit einer limbalen Stammzelltransplantation können die zuvor genannten Transplantationsverfahren bei Patienten mit LSZI zum Einsatz kommen. Neben der ausbleibenden Epithelregeneration würde es sonst zwangsläufig zur erneuten Konjunktivalisierung mit Neovaskularisationen und zu immunologischen Prozessen mit konsekutiver Abstoßungsreaktion kommen (33).

1.7.2 Transplantationschirurgie des Limbus

Während Patienten mit einer partiellen LSZI mittels Exzision des Bindehautepithels von der Hornhaut und ggf. einer ergänzenden Amniontransplantation therapiert werden können, ist dies bei totaler LSZI aufgrund des Ausfalls der kompletten stammzellbasierten Epithelregeneration nicht möglich (55).

Limbale Stammzellen zur Rekonstruktion von schweren Augenoberflächenerkrankungen wurden erstmalig im Jahre 1989 transplantiert. Damals erfolgte die Entnahme von Limbus- und Bindehautgewebe vom gesunden Partnerauge als autologes Spendergewebe zur Behandlung der Augenoberflächenerkrankung des kontralateralen Auges (56). Der Erfolg, der heute

als CLAU (*Conjunctival Limbal Autograft*) bezeichneten Transplantation, war ein Durchbruch für die limbale Stammzelltransplantationschirurgie. Es folgten Versuche mit anderen Spendergeweben und neuen Techniken. Um Patienten mit bilateraler LSZI behandeln zu können, erfolgte 1994 die erste allogene limbale Stammzelltransplantation mit Limbusgewebe von Organspendern (57). Kurze Zeit später erfolgte bereits die erste allogene Transplantation von limbalen Stammzellen mit einer zuvor mehrere Tage gelagerten korneoskleralen Gewebescheibe, heute als Keratolimbal Allograft (KLAL) bezeichnet (58).

Patienten mit unilateraler totaler LSZI werden noch immer mit autologen limbalen Stammzelltransplantationen behandelt. Der Vorteil, der nicht zu befürchtenden Immunreaktion durch das körpereigene Spendergewebe am erkrankten Auge, überwiegt in der klinischen Praxis häufig gegenüber dem Risiko einer iatrogenen LSZI am gesunden Auge. Zunächst wird der komplette Bindehautpannus vom erkrankten Auge entfernt, danach wird das Spendergewebe am gesunden Auge gewonnen. Tseng und Kenyon transplantierten anschließend zwei Limbustransplantate über drei Uhrzeiten direkt vom gesunden auf das erkrankte Auge (56). Auf diese Weise wurden jahrelang erfolgreiche limbale Stammzelltransplantationen durchgeführt. Bis heute sind nur wenige Berichte von Komplikationen, wie der von einer Patientengruppe mit kontaktlinseninduzierter LSZI, am gesunden Spenderauge durch die Transplantatgewinnung bekannt (59). Dennoch war der Wunsch groß, das Verfahren für das einzige gesunde Auge des Patienten weniger invasiv zu gestalten und das Risiko für Infektionen, Narben und eine LSZI am Spenderauge so gering wie möglich zu halten (60).

Bei der SLET (*Simple Limbal Epithelial Transplantation*) ist ein nur 2x2 mm großes autologes Transplantat vom gesunden Partnerauge nötig. Vor der Verwendung wird der Pannus am erkrankten Auge entfernt und anschließend eine AM mittels Fibrinkleber auf der Augenoberfläche befestigt. Das Limbustransplantat wird als Biopsat gewonnen, in bis zu zehn kleine Stücke zerteilt und mit dem Epithel nach oben erneut mittels Fibrinkleber auf der AM fixiert. Eine Stabilisierungsrate der Hornhautoberfläche von 76 %, nach über zwölf Monaten Beobachtungszeitraum post operativ, scheint die erhoffte *in vivo* Expansion der limbalen Stammzellen zu bestätigen. Der Ablauf und Mechanismus der Zellmigration der Stammzellen ist bis heute aber nicht geklärt (61).

Das Ziel, autologe Stammzellen nach der Entnahme und vor der Transplantation *ex vivo* zu kultivieren, um so aus einer kleinen Entnahme-Biopsie ein großes Transplantat gewinnen zu können, wird seit 1997 verfolgt (62). Bei den heute etablierten Methoden wird AM oder ein Fibrinsubstratträger als Gerüst für die Stammzellexpansion genutzt. Dieses Konzept der CLET (*Cultivated Limbal Epithelial Transplantation*) ist allerdings mit einer aufwendigen Infrastruktur und hohen Kosten verbunden. Das seit 2015 von der Europäischen Union zugelassene Holoclar® ist ein stammzellbasiertes Arzneimittel auf Fibrinbasis und nutzt das Prinzip der CLET (63).

Eine für beide Verfahren geeignete Patientengruppe bilden diejenigen mit einseitiger LSZI, besonders bei intakter Tränenproduktion. Holoclar® als erstes kommerziell verfügbares, stammzell-basiertes Arzneimittel ist zusätzlich auf die Behandlung von chemischen und thermalen Verbrennungen limitiert.

Für Patienten mit beidseitiger LSZI bleibt daher das Therapiemanagement der Augenoberflächen eine große Herausforderung, auch aufgrund des Mangels an transplantierbarem autologen Gewebes. Erste Praxiserfahrung bei einer kleinen Patientenanzahl besteht mit der COMET (*Cultivated Oral Mucosal Transplantation*), bei der *ex vivo* kultiviertes Mundschleimhautepithel transplantiert wird (64).

Durch diese Innovation kann zwar eine bilaterale LSZI mit einem autologen Transplantat behandelt werden, erneute Hornhautvaskularisationen und ein geringer Visusgewinn limitieren allerdings aktuell noch das Therapiekonzept (65). Für Patienten mit beidseitiger LSZI bleibt neben der bereits erwähnten KLAL (s. S. 16), bei der das Limbusgewebe am Hornhauttransplantat anhaftet, noch die Möglichkeit eines allogenen Bindehaut-Limbus-Transplantates. Bei dieser Transplantatform ist das limbale Gewebe der Bindehaut anhängig. Es kann sowohl von einem verstorbenen Organspender als c-CLAL (*cadaveric Conjunctival Limbal Allograft*), als auch von verwandten Lebendspendern als sogenanntes lr-CLAL (*living-relative Conjunctival Limbal Allograft*) gewonnen werden (41).

In allen Fällen einer allogenen Transplantation ist eine dauerhafte immunsupprimierende Therapie mit den verbundenen systemischen Nebenwirkungen vonnöten. Trotz dieser Therapie bleibt das Risiko eines Transplantatversagens aufgrund einer immunologischen Abstoßungsreaktion hoch, da allogenes Gewebe in den gut vaskularisierten Bereich des Limbus

transplantiert wird. Bei Patienten mit chronischen oder inflammatorischen Erkrankungen der Augenoberfläche, wie unter anderem dem Stevens-Johnson-Syndrom (s. Kapitel 1.7.1), steigt das Risiko noch einmal deutlich an (41,66).

1.7.3 Transplantationschirurgie der Amnionmembran

Die AM wurde erstmals 1940 zur Rekonstruktion der Augenoberfläche verwendet und hat sich, spätestens seit der steigenden Anzahl an Amniontransplantationen in den 1990er Jahren und mit der Standardisierung der Präparation und Konservierung, als wichtige Therapieoption im klinischen Alltag etabliert (67,68).

Die AM ist die innerste, gefäßfreie Schicht der Plazenta zum Fötus hin gelegen. Sie ist aus drei Schichten aufgebaut. Die Innerste bildet ein kuboides einlagiges Epithel mit zahlreichen Mikrovilli. Dem angelagert folgt die Basalmembran des Epithels. Sie besteht vorwiegend aus Kollagen sowie Laminin, Fibronektin und Hyaluronsäure. Die äußerste zum Chorion hin gelegene Schicht der AM bildet das Stroma. Es weist eine Dreiteilung in eine innere kompakte, eine mittlere lockere und eine äußere schwammige Ebene auf. Das Stroma besteht aus einer Kollagenmatrix und enthält locker angeordnete Fibroblasten in der mittleren Schicht (69).

Als Transplantat besitzt die AM gute mechanische, wachstumsfördernde, neurotrophe sowie antifibrotische, antientzündliche und antiangiogene Eigenschaften (35,70). Die Zellen der AM exprimieren sehr wenig *Human Leukocyte Antigen (HLA)* der Klassen Ia und Ib. Auf diese Weise provoziert die AM, obwohl allogenes Spendermaterial, keine immunologische Abstoßungsreaktion (71). Das Gewebe ist flexibel und elastisch, es bietet guten mechanischen Schutz gegen das Abtragen von neugebildetem Epithel als Folge der Reibung des Lidschlages (72). Durch die große Ähnlichkeit des Kollagenaufbaus der Basalmembranen von AM, Hornhaut und Bindehaut entsteht eine gute Leitstruktur für das Wachstum und die Adhäsion von Epithelzellen (73,74). Durch die Sezernierung des epithelialen Wachstumsfaktors (EGF), des Hepatozytenwachstumsfaktors (HGF) und des Keratinozytenwachstumsfaktors (KGF) fördert die AM die Proliferation und Differenzierung der Epithelzellen (75). Die neurotrophe Wirkung der AM kann auf Substanzen wie den neurotrophen Wachstumsfaktor (NGF) oder Ephrin A4 zurückgeführt werden (76,77). Durch die Unterdrückung der Proliferation und Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten wirkt die AM antifibrotisch

und regulierend auf die bereits beschriebene Stromaregeneration (s. Kapitel 1.6.4.2) (78). Die Zellen der AM produzieren antiangiogene Substanzen wie Thrombospondin 1 oder Endostatin, welche sich auch im Stroma nachweisen lassen (79). Die antiinflammatorische Wirkung eines Amniontransplantates entsteht durch die Unterdrückung zahlreicher inflammatorischer Zytokine der Augenoberfläche, wie die der Interleukin-1-Familie (80). Zusätzlich besitzt die AM die Fähigkeit, Entzündungszellen zu binden und deren Apoptose zu induzieren (81). Aufgrund dieser zahlreichen positiven Eigenschaften hat die AM große Relevanz als Transplantat zur Augenoberflächenrekonstruktion gewonnen. Zudem bestehen Möglichkeiten der Lagerung ohne diese Vorteile einzubüßen (82,83).

Die AM kann als Transplantat einlagig oder mehrlagig in den Defekt eingesetzt werden (*Inlay*) oder über den Defekt als Verband (*Patch*) gespannt werden (84,85). Beim Verwenden der AM als Transplantat (*Inlay*) erfolgt das Einnähen der AM mit der Basalmembran nach außen gerichtet, als Verband (*Patch*) verwendet spielt die Orientierung keine Rolle. Während das AM-Transplantat permanent verbleibt, wird der Verband in der Regel nach ca. einer Woche entfernt oder erneuert. Bei kryokonservierter AM entfallen nach dieser Zeitspanne die positiven Effekte der zuvor noch durch die Kälte devitalisierten Zellen sezernierten Substanzen. Beide Techniken können auch kombiniert zur Anwendung kommen. In diesem Fall dient der Verband dem Schutz des Transplantates (67). Nach einer Transplantation (*Inlay*) kann die AM im Ganzen in die Augenoberfläche integriert werden, ist aber noch Monate nach der Operation nachweisbar (74). Schlussendlich wird sie durch körpereigenes Gewebe ersetzt. Keratozyten wandern in das Gewebe der AM ein, differenzieren zu Myofibroblasten und bilden neues Kollagen zur Stromaregeneration (86,87).

Die klassischen Indikationen für ein Amniontransplantat (*Inlay*) sind persistierende Epitheldefekte und Ulzerationen. Als natürlicher Verband (*Patch*) hingegen wird die AM häufig in akuten Situationen wie bei Verbrennungen, der herpetischer Keratitis oder dem Stevens-Johnson-Syndrom angewandt. Darüber hinaus kommt die AM bei zahlreichen weiteren Indikationen zur Anwendung. Einige Beispiele sind die schmerzhafte bullöse Kerathopathie, die Defektdeckung nach der Entfernung von Narben, Tumoren oder einem Pterygium (67).

Bei der Therapie der LSZI wird die AM allein oder in Kombination mit verschiedenen Arten der Gewebetransplantation (CLAU, Ir-CLAL u. KLAL) genutzt. Die AM kann zur Therapie der LSZI auch als Substrat zur Expansion der transplantierten Zellen fungieren, dies kann vor der Transplantation *ex vivo* (CLET, COMET) oder nach der Operation *in vivo* (SLET) geschehen (88). Weitere neue Techniken zur Verwendung der AM werden bereits in der Klinik erprobt, wie die der AM-assistierten Umleitung von Bindehautepithelzellen zur Vermeidung einer Besiedelung der Hornhaut durch Bindehautgewebe nach erfolgter Stammzelltransplantation (89). Erste Anstrengungen werden bereits unternommen, AM zu klinisch leicht applizierbaren Augentropfen zu verarbeiten, um die Vorteile der AM zukünftig auch als konservative Therapie nutzen zu können (90).

1.7.4 Keratin als Alternative zur Rekonstruktion der Augenoberfläche

In den vergangenen Jahren wurde Keratin aus menschlichen Haaren als potente, vom Menschen stammende Ressource und natürlich gewinnbares Biomaterial erkannt. Besonders hervorzuheben ist die ausgezeichnete Biokompatibilität, die zellulären Interaktionsstellen und die biologische Abbaubarkeit (91). Keratine sind Proteine, die sich in harten oder filamentösen Strukturen wie Haaren, Nägeln, Hörnern, Hufen und Federn finden. Haarkeratine sind intrazelluläre Zytoskelettproteine, die in den Epithelfollikelzellen während der Haarentwicklung gebildet werden (35,92). Die cysteinreichen Strukturproteine weisen aufgrund einer Vielzahl von Disulfidbrücken eine hohe mechanische Festigkeit auf (35,93).

Keratine können in schwach verfestigte, sogenannte *weiche Keratine*, die beispielsweise Bestandteile der Haut bilden und *harte Keratine* in Haaren und Nägeln mit kohärenterer Struktur sowie höherem Gehalt an Schwefel und Lipiden unterteilt werden (94).

Keratine aus menschlichen Haaren werden folglich als harte Keratine klassifiziert und bestehen zu 65-96 % aus Proteinen, zu 1-9 % aus Lipiden und zu 3 % aus Melanin. Hinzu kommen Nebenverbindungen, die vor allem vom Feuchtigkeitsgehalt abhängen (91).

Die allgemein bekannte Hauptfunktion der Keratine als Bestandteil von Haut und Haaren besteht im Schutz der Epithelzellen vor physischem und nicht-physischem Stress. Allerdings wurden weitere komplexe Funktionen der Keratine entdeckt, bei

denen gewebespezifische Aufgaben der Zellsignal- und Zellstressbewältigung erfüllt werden (95). Keratine spielen beispielsweise eine wichtige zytoprotektive Rolle für die Zellen der Leber. Ein Fehlen oder eine Störung der Proteine führt zu deutlich fragileren Hepatozyten mit einer dramatisch erhöhten Anfälligkeit für stress- oder toxininduzierte Leberschäden (96).

Keratine, die traditionell aus tierischen Hartgeweben wie Wolle, Federn und Hörnern extrahiert wurden, sind schon lange und häufig in der Kosmetikindustrie im Einsatz. Jüngere Entwicklungen, das Keratin unter relativ milden Bedingungen aus menschlichem Haar zu extrahieren, haben jedoch zu einer beträchtlichen Anzahl erfolgreicher Biomaterialanwendungen geführt (91).

Bei der Extraktion der Keratine mittels Oxidation entstehen Keratosen, bei denen die Cysteinreste irreversibel zu Cysteinsäureestern oxidiert werden. Die Gewinnung der Proteine ausschließlich mit Reduktionsmitteln führt dazu, dass hydrophobe und bei PH-Wert Schwankungen stabilere Keratine entstehen.

Dabei werden die Disulfidbindungen des Cystin aufgebrochen und in 2 Cysteinreste umgewandelt (97). Keratin kann so als Biomaterial *in vivo* über Wochen bis Monate persistieren (98).

Das am häufigsten und auch für diesen Versuch verwendete Reagenz zur reduktiven Gewinnung des Keratins ist die von Nakamura et al. entwickelte Shindai-Lösung.

Die Shindai-Lösung besteht aus Tromethamin, Thioharnstoff, Harnstoff und 5 % Mercaptoethanol. Der Harnstoff und der Thioharnstoff führen zu Unterbrechungen von Wasserstoffbrückenbindungen und ermöglichen so den Zugang des reduzierenden Reagenz Mercaptoethanol zu den Disulfidbrücken. Diese reagieren mit dem Thiolat-Anion des Mercaptoethanols und die Disulfidbrücke wird aufgebrochen. Das Tromethamin wird zur optimalen PH-Einstellung zugegeben und obwohl Disulfidverbindungen bei hohen PH-Werten besonders leicht hydrolysiert werden können, liegt der PH-Wert der Shindai-Lösung bei 8,5. Denn stark alkalische Bedingungen über einem PH-Wert von 10,0 würden über eine Deamidierung zu Unterbrechungen in der Peptidkette des Proteins führen. Auf eine reduktive Extraktion folgt eine Dialyse, um die Chemikalien auszuwaschen und um die Disulfid-Cystin-Bindungen wieder herzustellen. Durch Reoxidation der Cystein-Thiolen entsteht auf diese Weise regeneriertes Keratin (97,99,100).

Auf dieser Grundlage können durch ein Verfahren von Reichl seit 2011 transplantierbare, standardisierte Filme mit hoher Transparenz aus Keratin hergestellt werden. Die Methode verwendet Haarkeratindialysat, einen Weichmacher (Glycerol) sowie einen kontrollierten Trocknungs- und Aushärtungsprozess (93).

Mittels Feinjustierungen im Herstellungsprozess, wie eine Veränderung der Keratindialysatzusammensetzung, des Gehaltes an Weichmacher sowie der Aushärtungstemperatur und -dauer ist es möglich, die KF möglichst optimal an die Anforderungen anzupassen (101).

1.8 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Ob KF ein potenzielles Biomaterial für die Rekonstruktion der Augenoberfläche darstellen, ist bislang ungeklärt. Frühere Versuche mit KF konnten zeigen, dass eine transparenzerhaltende Transplantation in das tiefe Stroma der Hornhaut möglich ist.

Durch die erstmalige Transplantation von KF in das apikale Stroma, bei zuvor erfolgter Epithelabtragung im Transplantatbereich, kann nun zum ersten Mal bewertet werden, ob ein Epithelschluss und damit eine Wundheilung im *in vivo* Modell über den KF hinweg gelingen kann.

Zusätzlich zur Epithelialisierung sollte die Transparenz bei geringer Entzündungs- und Neovaskularisationstendenz erhalten bleiben. Die Ergebnisse werden mit denen verglichen, die durch die Transplantation des klinisch etablierten Verfahrens einer AM erzielt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Herstellung der Keratinfilme

Die in dieser Arbeit verwendeten KF wurden von Prof. Reichl und seinem Team (Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Technische Universität Braunschweig, Mendelssohnstr. 1, 38106 Braunschweig, Deutschland) aus menschlichen Haaren nach der von Reichl 2011 entwickelten Methode präpariert und zur Verfügung gestellt (35,101).

Dazu wurden menschliche Haare von einem gewöhnlichen Friseursalon gewonnen und intensiv mit einer Mischung aus Wasser und 0.5 % Natriumlaurylsulfat (SDS) gewaschen. Anschließend wurden sie mit frischem Wasser gespült und luftgetrocknet. Um Lipidrückstände zu extrahieren, wurden die Haare im Anschluss für zwölf Stunden in n-Hexan eingelegt und danach erneut getrocknet, bis die n-Hexanrückstände verdunstet waren. Das trockene Haar wurde mit einer Kugelmühle vom Typ MM301 (Retsch, Haan, Deutschland) zu Pulver gemahlen (101). Aus dem so entstandenen Pulver wurde mit der Shindai Methode das menschliche Keratin als Basis für die Filme gewonnen (99). Eine 400 ml wässrige Extraktionslösung (pH 8.5) bestehend aus 25 mM Tromethamin-Hydrochlorid (Tris-HCL), 2.6 M Thiourea, 5 M Urea und fünfprozentigem 2-Mercaptoethanol wurde dabei mit 20 g des zuvor gewonnenen Haarpulvers vermischt und bei 50 °C für 72 h inkubiert. Die Mischung wurde bei einem Lastvielfachen (g-Wert) von 4500 für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Filterpapiers mit einer Porengröße von 2.5 mm gefiltert. Das so gewonnene Filtrat wird als Shindaiextrakt (SE) bezeichnet und wurde bei 20 °C bis zur Verwendung gelagert (99).

Eine Menge von 100 ml SE wurde mittels der Zellulosemembran MWCO (Spectra/Por®, molecular weight cut-off: 6-8000 Da) für 24 h bei 20 °C gegen 5000 ml destilliertes Wasser dialysiert. Die Dialyse wurde sechs Mal wiederholt, bis keine Osmolarität und kein 2-Mercaptoethanol mehr mit dem Ellmans Reagenz im Dialysat nachweisbar war. Um die groben Bestandteile zu entfernen, wurde das so entstandene wässrige Keratindialysat bei einem g-Wert von 10.000 für 30 min zentrifugiert und anschließend sofort für die Herstellung der KF verwendet (101).

In einem zweiten Verfahren wurde die gleiche Menge SE auf die gleiche Weise dialysiert, nur diesmal gegen 0.25 M Natriumhydroxidlösung (NaOH) bei 4 °C.

Die so gewonnene Lösung wurde mittels Ultrafiltration unter Verwendung einer Zellulosemembran MWCO 5000 Da und mit Hilfe des Vivaspin® 20 Konzentrators konzentriert. Das Filtrat wurde verworfen und der Überstand mit 0.05 µM NaOH verdünnt, um so das alkalische Keratindialysat zu erhalten (101).

Zur Herstellung der KF wurde das wässrige Keratinfilm-dialysat mit dem alkalischen Keratinfilm-dialysat im Verhältnis 9:1 vermischt und 1 % Glycerol hinzugefügt. Dieses Dialysatgemisch wurde auf hydrophob beschichtete Polyethylenplatten gegossen und über Nacht an der Luft getrocknet. Um biomechanisch stabile Filme zu erhalten, wurden diese im Trockenschrank für 2 h bei 110 °C ausgehärtet (35,101).

Vor der Verwendung wurden die Filme mittels H₂O₂ in einem Sterrad® 100S Plasmasterilisator (ASP, Irvine, California, USA) sterilisiert und mit einer Lösung aus PBS und 5 % Penicillin-Streptomycin (5000 U/ml, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) gewaschen. Diese Lösung wurde zwei Mal täglich für 7 Tage erneuert und die KF bis zur Transplantation für mind. 6 h in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) äquilibriert (35,36).

2.2 Die Amnionmembran

Die menschliche AM wurde bei elektiv durchgeführten Kaiserschnitten nach erfolgter Einverständniserklärung der werdenden Mutter gewonnen. Alle Methoden zur Gewinnung des menschlichen Materials unterliegen den ethischen Grundsätzen und Standards der Deklaration von Helsinki (35). Die intakte AM wurde mittels stumpfer Präparation vom Chorion getrennt, mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und auf 7.5 cm x 7.5 cm sterilen Nitrozellulosemembranen (Kantena, New Jersey, USA) mit dem Epithel nach oben aufgebracht. Anschließend wurde die AM in 50 % DMEM und 50 % Glycerol bei -80 °C bis zur Verwendung kryokonserviert (35,102).

2.3 Das Tiermodell

Alle durchgeführten Experimente unterliegen dem Standard der Beschlüsse für Tierversuche der Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO).

Der Versuch wurde beim Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW) angemeldet und genehmigt (Registrierungsnummer: 84-02.04.2011.A256).

Es wurden 30 weibliche Kaninchen der Rasse „Weiße Neuseeländer“ mit einem Gewicht von 2 kg bis 2,5 kg verwendet. Die Tiere wurden in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität in einem Tierhaltungsraum mit einer Luftwechselrate von 15 bis 20 pro Stunde, bei 50-70 % Luftfeuchtigkeit in Käfigen mit den Maßen 80 cm x 50 cm x 60 cm gehalten.

Die Tiere erhielten jeden Tag pro Kilogramm Körpergewicht 80 g Sniff-Alleinfuttermittel® für Kaninchen (Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest). Zusätzlich wurde einmal am Tag Heu gefüttert.

2.4 Die Operation

Alle Tiere erhielten zur Narkose vor Beginn der Operation eine intravenöse Injektion mit Ketaminhydrochlorid (25 mg pro kg Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (5 mg pro kg Körpergewicht). Bei allen 30 in den Versuch eingeschlossenen Tieren wurde nur das rechte Auge operiert (35).

Nach dem Erzielen einer ausreichenden Sedierung wurde das Auge zunächst mit Povidonjod 0,5 % desinfiziert und anschließend der Bulbus zur Stabilisierung prolabiert. Alle Operationsschritte wurden unter sterilen Bedingungen von demselben Operateur und mit Hilfe eines Operationsmikroskopes (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) durchgeführt (35).

Bei allen Tieren wurde eine superfizielle Keratektomie durchgeführt, bei der das Epithel und die obersten Stromaschichten im zentralen Bereich der Hornhaut entfernt werden. Die Keratektomie wurde mit einem Trepan mit 4 mm Durchmesser kreisrund im Zentrum der Hornhaut markiert. Anschließend wurden das Epithel und das anteriore Drittel des Stromas im markierten Bereich mittels Sichelmesser entfernt (s. Abb. 3a). Bei allen Tieren wurde nach erfolgter Keratektomie, abermals mit dem Sichelmesser, eine 360 Grad umfassende 2 mm große lamelläre Tasche

manuell in das tiefer gelegene Stroma präpariert (s. Abb. 3 b und Abb. 4 gelb umrandet). Darauffolgend wurden die Tiere je nach Versuchsgruppe unterschiedlichen Operationsmaßnahmen unterzogen (35).

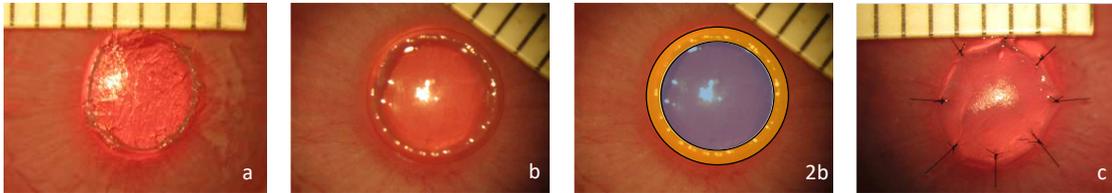


Abb. 3: **Intraoperative Darstellung** der Kontrollgruppe (a); der KF-Gruppe (b); der KF-Gruppe mit farblich hervorgehobener Lagedarstellung (2b): Der blaue Bereich markiert den KF im Bereich der Keratektomie, der gelbe Bereich den Teil des KF innerhalb des Stromas; der AM-Gruppe (c)

Bei der Kontrollgruppe war die Operation im Bereich der Hornhaut damit beendet und die Tiere erhielten am Ende des Eingriffes eine Silikonhydrogel-Kontaktlinse mit einem Durchmesser von 13,8 mm (Air Optix Night&Day Aqua, Alcon, Freiburg, Deutschland) und final eine Tarsorrhaphie. Bei der lateralen Tarsorrhaphie wird die Nickhaut von nasal nach temporal über den Bulbus gespannt und seitlich fixiert. In diesem Versuch erfolgte die Naht mittels nicht resorbierbarer monofiler Fäden in der Stärke 5,0.

Die AM wurde mittels einer 4 mm Biopsiestanze vor der operativen Verwendung zugeschnitten. Bei den Tieren der AM-Gruppe wurde diese mittels 10,0 Nylon Einzelknopfnähten so im Stroma der Hornhaut fixiert, dass die AM den Bereich der superfiziellen Keratektomie bedeckte (s. Abb. 3 c).

Die KF könnten genau wie eine AM mit Einzelknopfnähten im Bereich der Hornhaut fixiert werden (103). Die Nähte in den KF zeigten in vorherigen Studien postoperativ allerdings eine höhere Lockerungsneigung, welches zu einer schlechteren Lage und damit Anpassung der KF an die Augenoberfläche führen könnte (36). Aufgrund dieser Beobachtung wurden die KF in dem hier beschriebenen Versuch nahtlos, mithilfe einer intrastromalen Tasche im Randbereich des KF, auf der Augenoberfläche fixiert (35). Dazu wurde bei den Tieren der KF-Gruppe in die präparierte stromale Tasche ein KF-Implantat eingesetzt. In einem Zwischenschritt wurden im Durchmesser 5 mm große,

kreisförmige KF-Implantate mit einer 5 mm Biopsiestanze (PFM Medical, Köln, Germany) aus den KF ausgestanzt. Die KF-Implantate wurden in die zuvor geschnittene stromale Tasche eingesetzt, sodass ihr Rand in die Tasche hineinragte. Der äußere Ring des kreisrunden Implantates steckte somit zwischen zwei stromalen Blättern in der Tasche und verankerte den KF im Stroma. Der innere Teil des KF lag dem Stroma nur auf und bildete in diesem Bereich die aktuelle Augenoberfläche, da das Epithel und das anteriore Stroma durch die superfizielle Keratektomie fehlte (s. Abb. 3 und Abb. 4). Im Anschluss erhielten alle Tiere mit KF- oder AM-Transplantat ebenfalls eine Silikonhydrogel-Kontaktlinse und eine laterale Tarsorrhaphie (35).

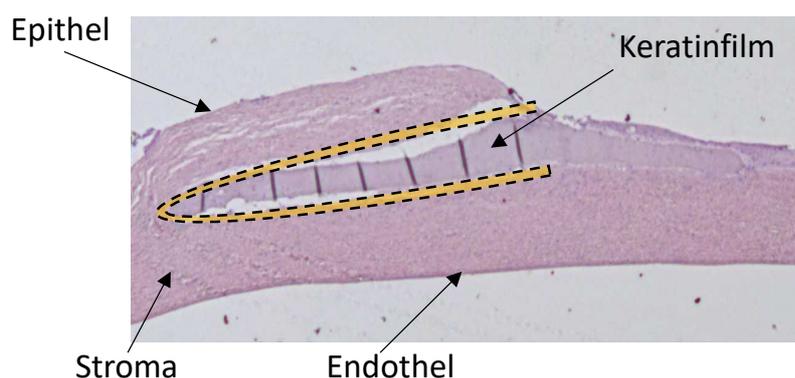
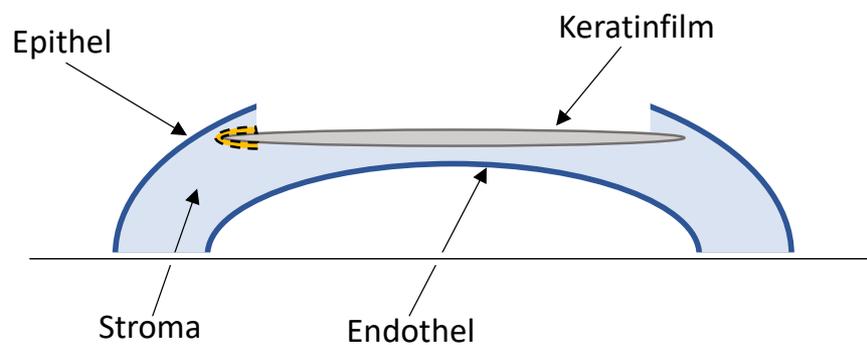


Abb. 4: **Implantatlage** Schematische Darstellung (oben) und histologische Ansicht (unten, nach 10 Tagen, HE-Färbung) der Lage des KF innerhalb der Stromatasche (gelb umrandet)

2.5 Verlauf und Gruppen

Insgesamt wurden 30 Tiere in den Versuch eingeschlossen. 10 Tiere erhielten ein KF-Implantat, 10 Tiere eine AM und 10 Tiere wurden der Kontrollgruppe zugeordnet. Jeweils die Hälfte jeder Gruppe (5 Tiere) wurde entweder der 10 Tages- oder 4-Wochen-Kohorte zugeteilt. So wurden 15 Tiere (je 5 Tiere aus jeder Gruppe) über einen Zeitraum von 10 Tagen und 15 Tiere (ebenfalls 5 Tiere aus jeder Gruppe) über einen Zeitraum von 4 Wochen untersucht und behandelt (vgl. Abb. 5).

Alle Tiere erhielten zwei Mal täglich Ofloxacin (3 mg/ml, Bausch und Lomb, Rochester, New York, USA) und Dexamethason (1,3 mg/ml, Bausch und Lomb, New York, USA) Augentropfen über die gesamte Dauer des Versuches, je nach Kohorte folglich für die Dauer von 10 Tagen oder 4 Wochen.

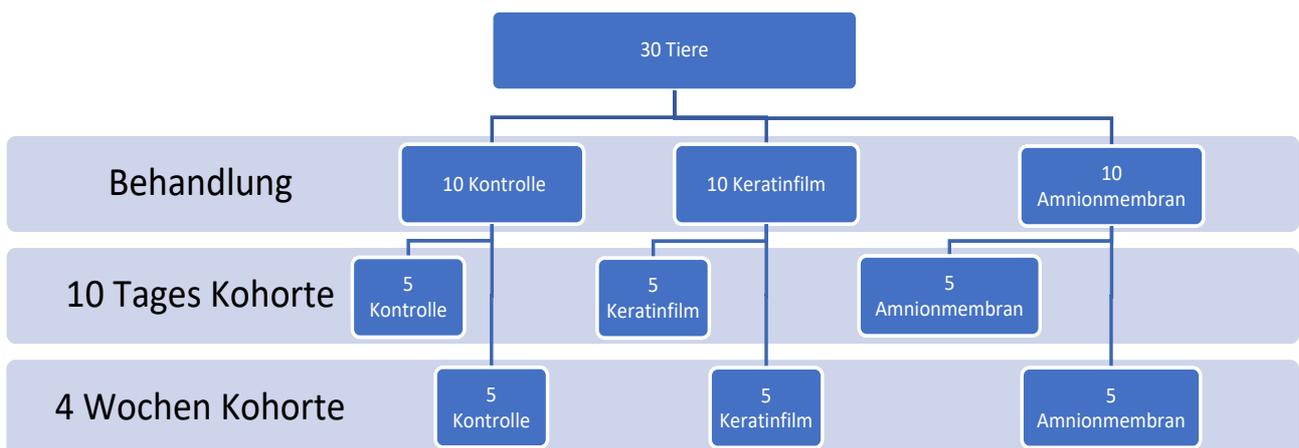


Abb. 5: **Tierkohorten und -gruppen** Übersicht über die Zuordnung der Versuchstiere zu ihren jeweiligen Behandlungsgruppen und Kohorten

Die Tiere wurden jeweils zu festgelegten Untersuchungstagen wie oben beschrieben narkotisiert (s. Abb. 6), die Tarsorrhaphie eröffnet, die Kontaktlinse entfernt und die Hornhaut klinisch beurteilt. Die Untersuchungstage der 10 Tages Kohorte waren Tag 3, Tag 7 und Tag 10, die der 4 Wochen Kohorte waren Tag 7, Tag 14, Tag 21 und Tag 28 (s. Abb. 6).



Abb. 6: **Übersicht über den zeitlichen Ablauf des Versuches**

Während jeder Untersuchung wurden Fotos mit einer Digitalkamera (Canon Ixus 117HS) über das Operationsmikroskop geschossen. Mit einem Millimeterlineal wurden dabei mögliche Epitheldefekte auf den Fotos in ihrer Größe messbar dokumentiert.

Alle Augen erhielten zusätzlich Natrium-Fluorescein Augentropfen (Fluosine® Fluorescein 2 %, Pharma Stulln GmbH, Stulln, Deutschland) und wurden während der Untersuchung mit kobaltblauem Licht im Wellenlängenbereich von 450-500 nm bestrahlt, um so mögliche Epitheldefekte zu visualisieren (35).

Alle Untersuchungen wurden stets von demselben Untersucher nach einem festen Kriterienkatalog beurteilt (s. Abb. 7) (104).

Zur Auswertung des Ergebnisses wurde für jeden Untersuchungstag der Mittelwert der jeweiligen Einzelkriterien Epitheldefekt, Neovaskularisation und Transparenz gebildet. Zusätzlich wurde der sogenannte Hornhautscore aus der Summe der Mittelwerte der Einzelkriterien berechnet, welcher den klinischen Zustand der Hornhäute zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt insgesamt abbildet (35).

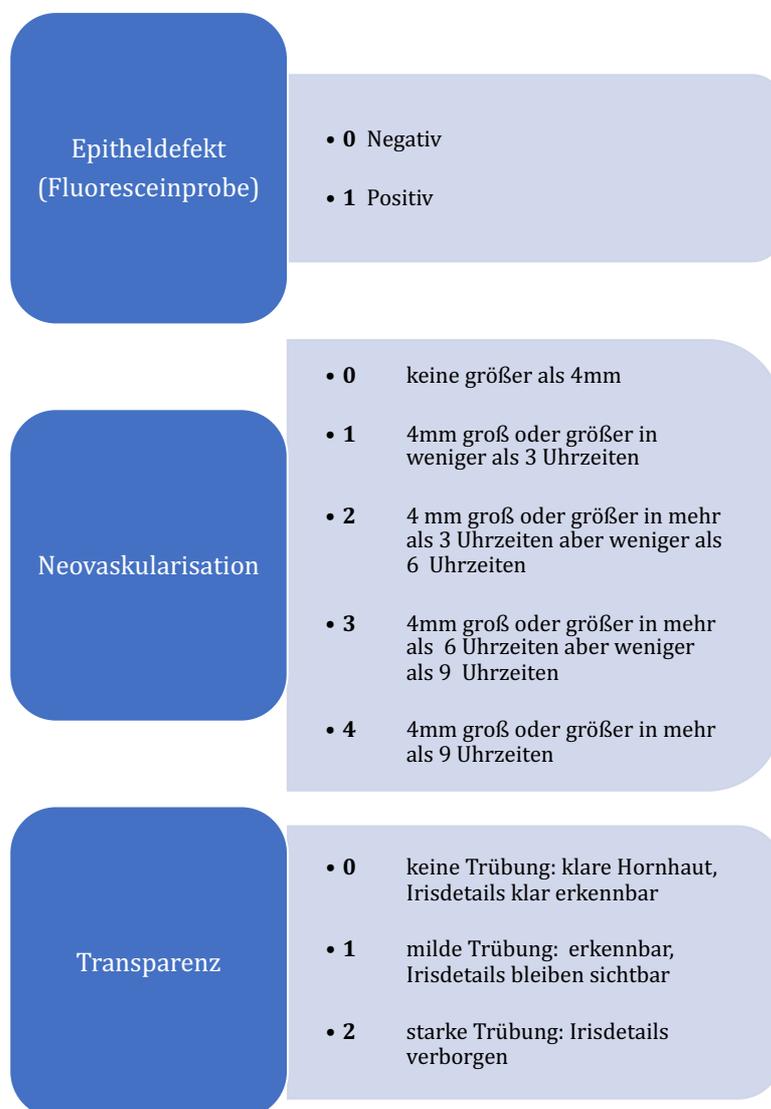


Abb. 7: **Klinische Kriterien** zur Bewertung und Quantifizierung des Befundes der Hornhaut an den Untersuchungstagen (104)

2.6 Histologie

Am Ende der Versuchszeit nach der Abschlussuntersuchung, je nach Kohorte an Tag 10 oder an Tag 28, erfolgte die Euthanasie der Tiere mittels Isofluran als Inhalationsanästhetikum und anschließend die Entnahme der Hornhaut zur Aufbereitung für die histologische Auswertung.

Die Hornhäute wurden in Technovit 8100® (Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) folgend dem Standardprotokoll des Herstellers für die Gewebevorbereitung und das Einbettungsverfahren eingebettet.

Dafür wurde die Hornhaut limbusnah mittels Schere aus dem Bulbus herausgetrennt und sofort in PBS mit 2 % Paraformaldehyd für 4 h bei einem pH-Wert von 7,4 und einer Temperatur von 4 °C fixiert. Danach wurde das Gewebe in PBS mit einem Zusatz von 6,8-prozentiger Saccharose für 12 h bei 4 °C nachbehandelt. Anschließend wurden alle Gewebeproben mit 100 % Aceton gewaschen und bis zum Entwässern der Hornhaut in Aceton gelagert (Technovit, Gebrauchsanweisung 8100).

Nach der Fixation und der Dehydration der Hornhäute wurde das Gewebe für 6-10 h bei 4 °C in die Infiltrationslösung, bestehend aus 100 ml Technovit 8100 Basislösung und 0,6 g Technovit 8100 Härter 1, gegeben.

Für das Einbetten der Gewebeprobe in festem Material, die Polymerisation, wurden die Hornhäute zunächst mittig geteilt und in der Tefloneinbettform Histoform S® platziert.

Die Schnittkanten lagen dem Boden der Mulden in der Form auf (s. Abb. 8). Durch Vermischen von 15 ml Infiltrationslösung mit 0,5 ml Technovit 8100 Härter 2 entstand nach fünf Minuten die Polymerisationslösung. Mittels einer Pipette wurden mit dieser die Mulden bis zum Rand befüllt und die Form anschließend luftdicht mit einer Polyethylenfolie verschlossen. Während der Polymerisationsdauer von mindestens 3 h wurde die Einbettform bei 4 °C gelagert, um die optimale Temperatur für das Katalysatorsystem des Kältepolymerisationsprozesses zu gewährleisten. Die Farbe der Polymerisationslösung veränderte sich von zuerst gelblich-grünlich zu transparent als der Prozess abgeschlossen war (105).

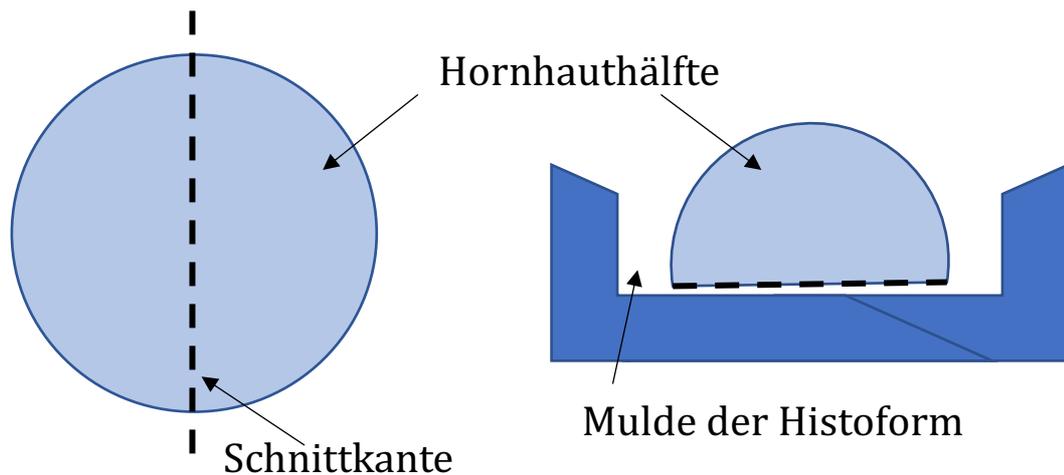


Abb. 8: **Schematische Darstellung der Hornhautschnittkante** und ihrer späteren Lage in der Histoformmulde

Die eingebetteten Hornhauthälften wurden nach vollständiger Aushärtung von Technovit8100® mit Histobloc® und Technovit3040® aufgeblocckt. Dazu wurde zunächst die Folie von den Muldenöffnungen der Histoform S® entfernt und anschließend der Histbloc® als Trägerteil auf die Mulden der Histoform S® gestellt. Der Histbloc® verfügt über eine Öffnung für Technovit3040®, ein schnellhärtender 2-Komponenten-Kunststoff auf Methylmethacrylat-Basis, der eine feste Verbindung mit dem Histobloc® und dem Technovit8100® in der Mulde eingeht. Technovit 3040® wurde flüssig in die Histobloc® Formen gefüllt und härtete nach circa fünf Minuten aus. Die Gewebeprobe wurden mit einem Rotationsmikrotom (Leica Mikrotom RM 2255, Leica GmbH, Nussloch, Deutschland) in vier µm dicke Schnitte geschnitten und auf Objektträger aufgezogen. Jeder fünfte Schnitt wurde mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt, um bei der späteren Mikroskopie die unterschiedlichen Gewebestrukturen und deren Veränderungen beurteilen zu können. Durch die Färbung werden Zellkerne und Keratin blau dargestellt, alle anderen Gewebe, wie das kollagenreiche Stroma, rötlich in unterschiedlichen Intensitäten. Zunächst wurden die Schnitte für 15 min in Hämatoxylinlösung (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt, danach für 10 min in Leitungswasser gebläut und zum Abschluss kurz in destilliertem Wasser gespült. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit Eosin. Dazu wurden die Schnitte für fünf Minuten in 0,5 % Eosin-G-Lösung (Eosin G-Lösung wässrig, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert,

kurz mit destilliertem Wasser gespült und danach in einer Alkoholreihe mit aufsteigender Konzentration (70 %, 95 %, 99,8 %) entwässert. Zur Klärung wurden die Schnitte anschließend fünf Minuten in Xylol (Xylol Isomere für Histologie, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) getaucht und abschließend mit Roti® Histo Kitt II (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt.

Alle histologischen Schnitte wurden nach einem standardisierten Bewertungssystem (s. Abb. 9) im Hinblick auf die Entzündung ausgewertet (35,106–108). Dazu wurden fünf zentrale Schnitte pro Hornhaut von einem unabhängigen Untersucher, Facharzt für Pathologie, betrachtet und bewertet sowie die Scorewerte von null bis vier vergeben (s. Abb. 9). Bei jedem Tier der KF- und AM-Gruppe wurde bei diesem Vorgang das Vorhandensein des Implantates im histologischen Präparat geprüft. Der Scorewert für die Histologie wurde aus dem Mittelwert der Einzelergebnisse der Augen für jede Versuchsgruppe gebildet (35).

Histologiebewertungssystem	
Scorewert	Inflammation
0	Keine Entzündungszellen
1	Sehr wenige Entzündungszellen
2	Wenige Entzündungszellen, nur im Bereich der Keratektomie und Stromatasche
3	Viele Entzündungszellen, auch im umgebenen Stroma
4	Sehr viele Entzündungszellen, über die ganze Tiefe der Hornhaut

Abb. 9: **Das histologische Scoringssystem** mit den Kriterien zur Bewertung der Entzündung der Hornhaut am Ende des Versuches (105,106).

2.7 Datenauswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Statistiksoftware Prism 9.0.0 (GraphPad, La Jolla, California, USA). Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Zum Vergleich der beiden Interventionsgruppen und der Kontrollgruppe im Zeitverlauf wurde für jeden einzelnen Parameter sowie für den kumulierten Hornhautscore eine Zwei-Wege-ANOVA mit einem Dunn-Bonferroni-Post-hoc-Test durchgeführt. Veränderungen im Laufe der Zeit in jeder separaten Gruppe und Unterschiede in der endgültigen Transparenz in den drei Gruppen wurden mit einer Einweg-ANOVA berechnet. Der Einfluss auf die endgültige Transparenz wurde mit der Spearman-Korrelation analysiert. Als signifikant galten Testergebnisse mit einem Wert $p < 0,05$ (35).

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Ergebnisse

3.1.1 Epitheldefekt

Abbildung 10 zeigt den Mittelwert des Scores des Epitheldefektes in der 10 Tage Kohorte an den Untersuchungstagen. An Tag drei zeigte sich in der Kontrollgruppe bei 1/5 Tieren ein kompletter Epithelschluss. In der KF-Gruppe und in der AM-Gruppe bestand an Tag drei noch bei allen Tieren (5/5) ein Epitheldefekt. Während in der Kontrollgruppe und in der KF-Gruppe an Tag 7 bereits 5/5 der Tiere einen kompletten Epithelschluss zeigten, waren es in der AM-Gruppe erst 3/5. An Tag sieben bestand damit ein signifikanter Unterschied zwischen der AM- und der Kontrollgruppe ($p = 0,0046$) und ebenso zwischen der AM- und der KF-Gruppe ($p = 0,0046$).

An Tag 10 war noch bei einem Tier in der AM-Gruppe ein Epitheldefekt vorhanden (1/5). Alle anderen Tiere wiesen ein geschlossenes Epithel auf. Bei keinem der Tiere kam es im Verlauf zu einem erneuten Epitheldefekt bei zuvor geschlossener Augenoberfläche.

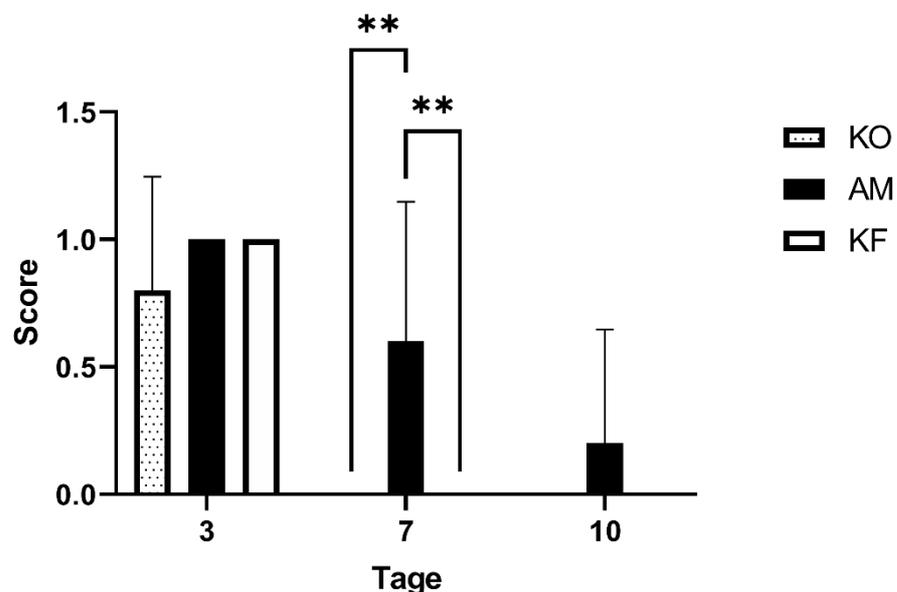


Abb. 10 **Epitheldefekt der 10 Tage Kohorte**, KO=Kontrollgruppe, AM=AM-Gruppe KF=KF-Gruppe, Score=Mittelwerte der Scorewerte des Epitheldefektes der Versuchsgruppen, $p < 0,05 = *$, $p < 0,005 = **$

Abbildung 11 zeigt den Mittelwert des Scores des Epitheldefektes in der 28 Tage Kohorte an den Untersuchungstagen.

Ab Tag sieben war in der Kontrollgruppe bei 5/5 der Tiere das Epithel komplett geschlossen. In der Kontrollgruppe ließen sich auch zu den späteren Untersuchungszeitpunkten keine Epitheldefekte mehr nachweisen.

In der AM-Gruppe war an Tag 7 noch bei 2/5 der Tiere ein Epitheldefekt nachweisbar. 5/5 der mit einem KF behandelten Tiere zeigten an Tag 7 noch einen Epitheldefekt.

An Tag 14 zeigte sich in der AM-Gruppe noch bei 2/5 der Tiere und in der KF-Gruppe noch bei 3/5 der Tiere ein Epitheldefekt. An Tag 21 bestand in der AM-Gruppe wieder bei 3/5 der Tiere ein Epitheldefekt und in der KF-Gruppe noch bei 2/5. Bis zum Versuchsende an Tag 28 nahm die Zahl der Tiere mit Epitheldefekt in der AM-Gruppe auf 4/5 zu, in der KF-Gruppe auf 1/5 ab. Zu keinem Zeitpunkt zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der AM- und der KF-Gruppe (alle $p > 0,0541$).

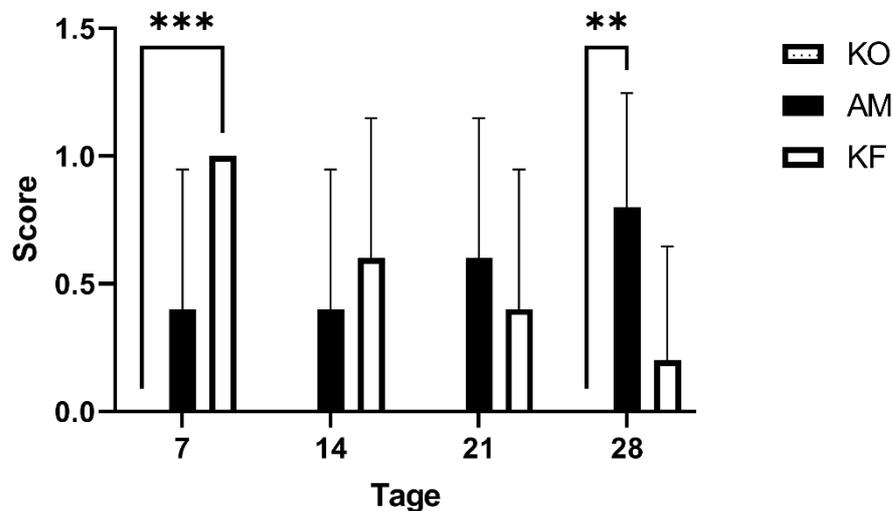


Abb. 11 **Epitheldefekt der 28 Tage Kohorte**, KO=Kontrollgruppe, AM=AM-Gruppe KF=KF-Gruppe, Score=Mittelwerte der Scorewerte des Epitheldefektes der Versuchsgruppen, $p < 0,05 = *$, $p < 0,005 = **$, $p < 0,0005 = ***$

3.1.2 Neovaskularisation

Abbildung 12 zeigt den Mittelwert des Scores der Neovaskularisation in der 10 Tage Kohorte an den Untersuchungstagen. Hier zeigten 2/5 der Tiere der AM-Gruppe an Tag 7 eine Neovaskularisation. Die Gefäßneubildung ist an Tag 10 bei beiden Tieren nicht mehr erkennbar. An Tag 7 bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der Amnion- und der Kontrollgruppe ($p = 0,0039$) sowie zwischen der Amnion- und der KF-Gruppe ($p = 0,0039$). In der Kontrollgruppe und in der KF-Gruppe zeigten sich in der 10 Tages Kohorte zu keinem Zeitpunkt Neovaskularisationen.

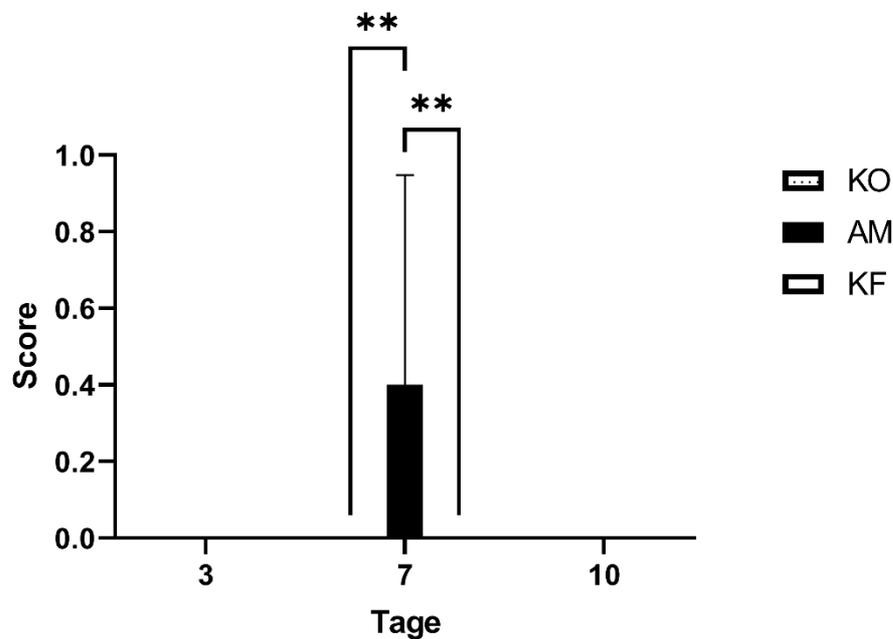


Abb. 12 **Neovaskularisationen der 10 Tage Kohorte**, KO=Kontrollgruppe, AM=AM-Gruppe KF=KF-Gruppe, Score=Mittelwerte der Scorewerte der Neovaskularisation der Versuchsgruppen, $p < 0,05 = *$, $p < 0,005 = **$

Abbildung 13 zeigt den Mittelwert des Scores der Neovaskularisation in der 28 Tage Kohorte an den Untersuchungstagen. Hier zeigten sich in der Kontrollgruppe und in der KF-Gruppe zu keinem Zeitpunkt Neovaskularisationen. In der AM-Gruppe zeigte sich bei 1/5 Tieren ab dem 21. Tag eine Neovaskularisation, diese war auch am 28. Tag, bei Abschluss des Versuches, noch erkennbar. Diese Neovaskularisation befand sich im Bereich eines gelockerten Fadens im Randbereich der AM. Zu keinem Zeitpunkt waren die Unterschiede zwischen den Gruppen signifikant ($p > 0,2039$).

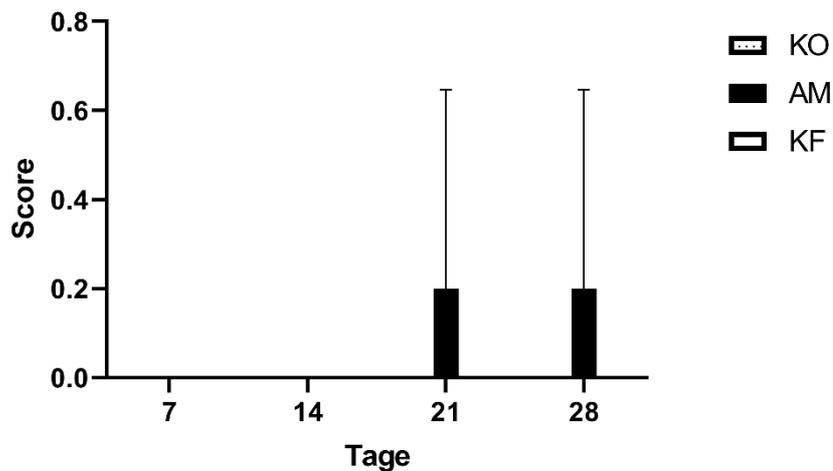


Abb. 13 **Neovaskularisationen der 28 Tage Kohorte**, KO=Kontrollgruppe, AM=AM-Gruppe, KF=KF-Gruppe, Score=Mittelwerte der Scorewerte der Neovaskularisation der Versuchsgruppen

3.1.3 Transparenz

Abbildung 14 zeigt den Mittelwert des Scores der Transparenz an den Untersuchungstagen in der 10 Tage Kohorte. Der Score für die Transparenz war in der Kontrollgruppe zu jedem Untersuchungszeitpunkt und bei jedem Tier stets „0“. Die mit AM behandelten Augen wiesen alle (5/5) an den Untersuchungstagen drei und sieben noch Trübungen der Hornhaut auf. Die Irisdetails blieben dabei stets erkennbar und der Score betrug an diesen Tagen für alle Tiere „1“. Bis zum Ende des Versuches, an Tag zehn, hatte sich die Transparenz bei 3/5 der Tiere auf den Wert „0“ gebessert, die restlichen 2/5 der Tiere schlossen den Versuch mit dem Scorewert „1“ ab.

Bei den mit KF behandelten Augen zeigten sich an Tag drei und sieben noch bei 5/5 der Tiere eine Trübung, die Irisdetails blieben dabei stets erkennbar und der Score betrug „1“. Bis zum Ende des Versuches, an Tag 10, hatte sich die Transparenz bei 2/5 der Tiere auf den Wert „0“ gebessert, die restlichen 3/5 schlossen den Versuch mit dem Wert „1“ ab. Es zeigte sich an jedem Untersuchungstag ein signifikanter Unterschied zwischen den Interventionsgruppen (AM und KF) und der Kontrollgruppe (alle $p < 0,05$).

Zu keinem Zeitpunkt zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der AM- und der KF-Gruppe (alle $p > 0,686$).

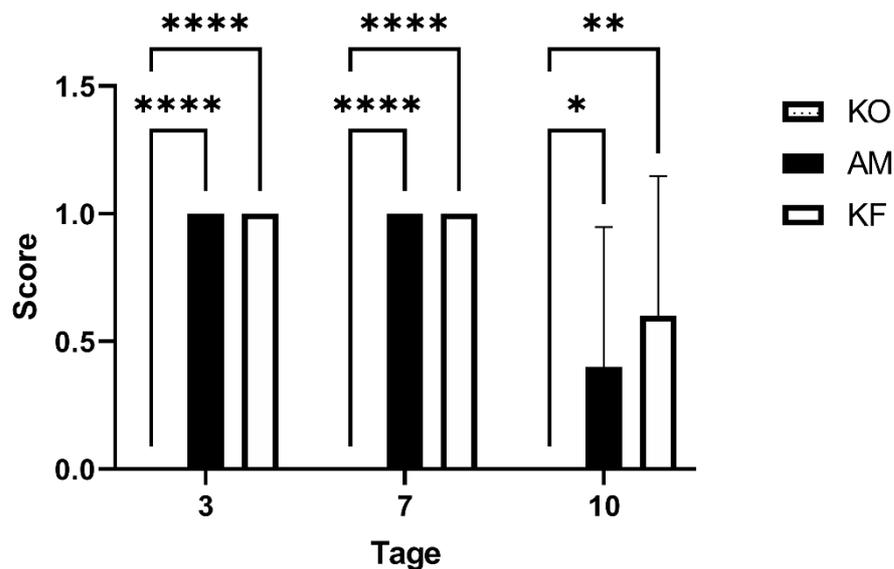


Abb. 14 **Transparenz der 7 Tage Kohorte**, KO=Kontrollgruppe, AM=AM-Gruppe
 KF=KF-Gruppe, Score=Mittelwerte der Scorewerte der Transparenz der
 Versuchsgruppen, $p < 0,05 = *$, $p < 0,005 = **$, $p < 0,0005 = ***$, $p < 0,00001 = ****$

Abbildung 15 zeigt den Mittelwert des Scores der Transparenz in der 28 Tage Kohorte an den Untersuchungstagen. Der Scorewert für die Transparenz betrug in der Kontrollgruppe wie schon im 10-Tage-Versuch für alle Hornhäute stets „0“.

An Tag sieben zeigten 5/5 der Tiere der KF-Gruppe Trübungen, welche alle mit dem Scorewert „1“ bewertet wurden (Irisdetails erkennbar). An Tag 14 wiesen noch 4/5 der Tiere mit einem KF den Scorewert „1“ auf, 1/5 zeigte eine transparente Hornhaut (Scorewert „0“). Ab Tag 21 zeigte keines der Tiere aus der KF-Gruppe mehr Trübungen der Hornhaut, alle erhielten zu diesem Zeitpunkt den Scorewert „0“. Schlussendlich beendeten auch alle (5/5) Tiere der KF-Gruppe an Tag 28 den Versuch mit dem Scorewert „0“.

Von den mit einer AM behandelten Augen wiesen an Tag sieben noch 4/5 Trübungen der Hornhaut auf, bei einem der Tiere waren die Irisdetails nicht erkennbar (Scorewert „2“). An Tag 14 zeigten nur noch 2/5 eine Hornhauttrübung, allerdings waren in beiden Fällen die Irisdetails verdeckt (Scorewert „2“). An Tag 21 stieg die Anzahl der Tiere mit Trübungen in der AM-Gruppe auf 3/5 an und dies blieb bis zum Versuchsende unverändert. Nur an Tag sieben zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der AM- und der KF-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p = 0,0112$). Während sich die Transparenz im Zeitverlauf von 28 Tagen für die AM-Gruppe nicht signifikant veränderte ($p = 0,7110$), verbesserte sie sich in der KF-Gruppe während dieser Zeitspanne signifikant ($p = 0,0063$). Während die Neovaskularisation keinen signifikanten Einfluss auf die Transparenz hatte ($p = 0,0667$, Spearman's $r = 0,6202$), hatten Epitheldefekte einen signifikanten Einfluss ($p = 0,0220$, Spearman's $r = 0,7032$).

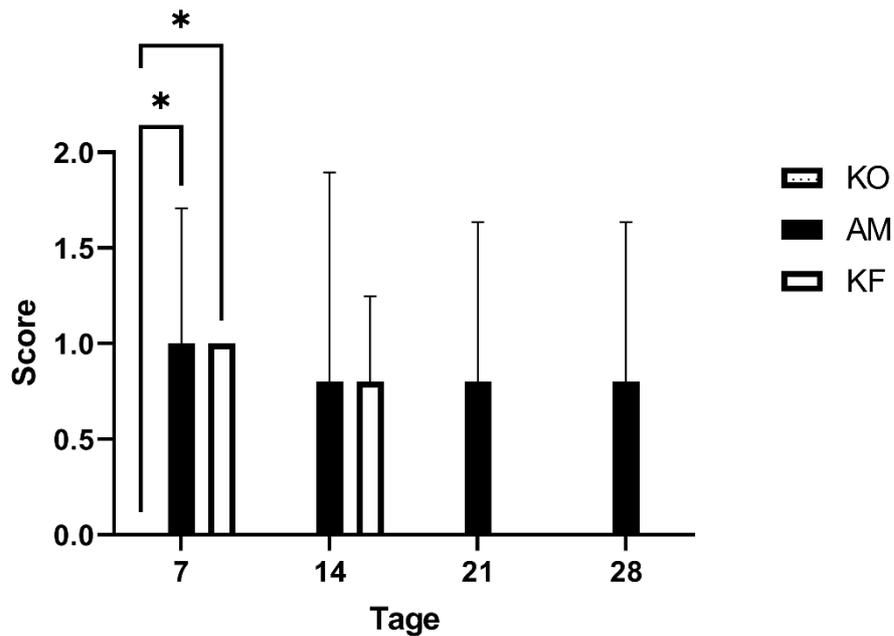


Abb. 15 **Transparenz der 28 Tage Kohorte**, KO=Kontrollgruppe, AM=AM-Gruppe, KF=KF-Gruppe, Score=Mittelwerte der Scorewerte der Transparenz der Versuchsgruppen, $p < 0,05 = *$

3.1.4 Hornhautscore

Abbildung 16 zeigt den Mittelwert des kumulierten Hornhautscores der 10 Tage Kohorte. Dieser ergibt sich aus der Summe der Werte der vorherigen drei Kriterien (Epitheldefekt, Neovaskularisation, Transparenz).

An Tag drei lag der Hornhautscore aller Tiere, die mit einer AM oder einem KF behandelt worden sind, bei „2“. An Tag 7 fiel der Mittelwert des Hornhautscores in der KF-Gruppe durch den Epithelschluss bei allen (5/5) Tieren auf den Wert „1“ (s. Abb. 10). Der Mittelwert der AM-Gruppe lag an Tag 7 mit dem Wert „2“ noch doppelt so hoch, bedingt durch den weiter bestehenden Epitheldefekt bei 3/5 der Tiere (s. Abb. 10) sowie durch die auftretenden Neovaskularisationen bei 2/5 der Tiere (s. Abb. 12). An Tag 7 zeigte sich daher ein signifikanter Unterschied zwischen der AM- und der KF-Gruppe ($p = 0,0032$).

Während sich in der AM-Gruppe an Tag 10 noch ein Epitheldefekt zeigte (s. Abb. 10), war die Transparenz in der KF-Gruppe bei Versuchsabschluss reduzierter (s. Abb. 14), beide Interventionsgruppen schlossen insgesamt den Versuch mit dem gleichen Mittelwert im kumulativen Hornhautscore ab.

In der 10 Tage Kohorte wurden für beide Interventionsgruppen signifikante Veränderungen im Zeitverlauf gefunden (AM-Gruppe: $p = 0,0192$; KF-Gruppe: $p = 0,00070$).

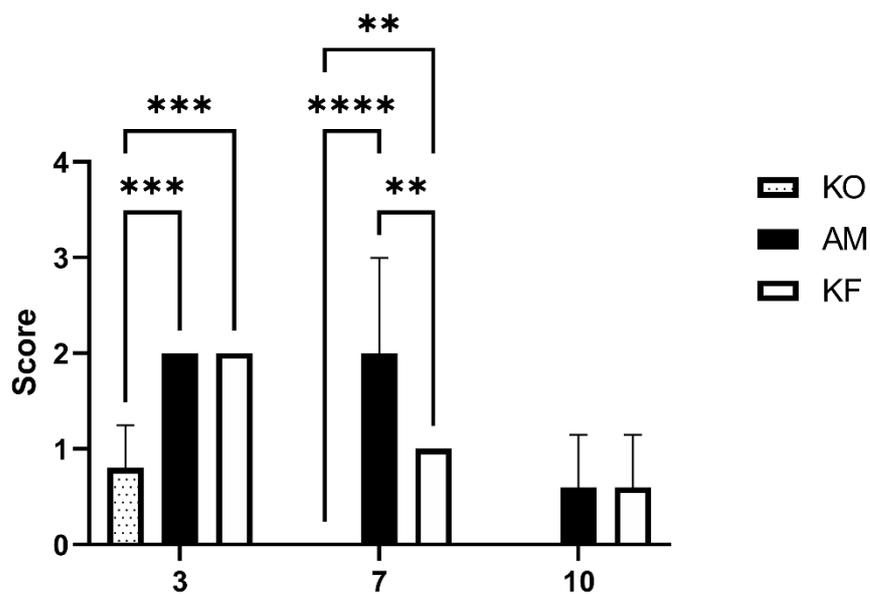


Abb. 16 **Hornhautscore der 10 Tage Kohorte**, KO=Kontrollgruppe, AM=AM-Gruppe KF=KF-Gruppe, Score=Mittelwerte der Scorewerte des Hornhautscores der Versuchsgruppen, $p < 0,05 = *$, $p < 0,005 = **$, $p < 0,0005 = ***$, $p < 0,00001 = ****$

Abbildung 17 zeigt die Mittelwerte des Hornhautscores der 28 Tage Kohorte an den Untersuchungstagen. Die Kontrollgruppe wies ab dem ersten Untersuchungstag bis zum Versuchsabschluss bei 5/5 der Tiere den Scorewert „0“ auf.

An Tag 7 erhielten alle Tiere mit KF den Scorewert „2“, bedingt durch die bestehenden Epitheldefekte und die leichten Transparenzminderungen (s. Abb. 11 und Abb. 15).

Mit Voranschreiten des Versuches schloss sich das Epithel kontinuierlich bei immer mehr Tieren (s. Abb. 11). Ab Untersuchungstag 21 waren alle Hornhäute der KF-Gruppe transparent (s. Abb. 15). Neovaskularisationen traten in der KF-Gruppe zu keinem Zeitpunkt auf. Der Mittelwert des Hornhautscores sank daher bis zum letzten Versuchstag, Tag 28 (s. Abb. 17).

Am ersten Untersuchungszeitpunkt, Tag sieben, lag der Mittelwert des Hornhautscores in der AM-Gruppe unter dem der KF-Gruppe. Durch eine Zunahme der Epitheldefekte im Versuchsverlauf (s. Abb. 11) sowie die neu gebildeten Neovaskularisationen (s. Abb. 13) bei konstanter Transparenzminderung (s. Abb. 15) stieg der Mittelwert des Hornhautscores ab Tag 21 in der AM-Gruppe an. Während sich der Hornhautscore für die AM-Gruppe in der 28 Tage Kohorte im Zeitverlauf nicht signifikant veränderte ($p = 0,4749$), verbesserte er sich in der KF-Gruppe signifikant ($p = 0,0257$). Bei Versuchsende, an Tag 28, bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der KF- und der AM-Gruppe ($p = 0,0235$).

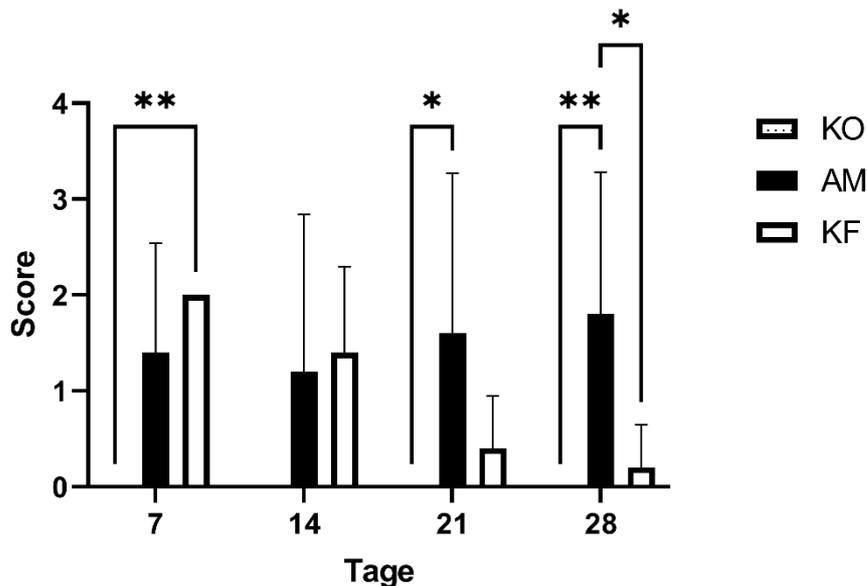


Abb. 17 **Hornhautscore der 28 Tage Kohorte**, KO=Kontrollgruppe, AM=AM-Gruppe, KF=KF-Gruppe, Score=Mittelwerte der Scorewerte des Hornhautscores der Versuchsgruppen, $p < 0,05 = *$, $p < 0,005 = **$

3.2 Inflammation in der Histologie

In der Kontrollgruppe erhielten alle Augen an Tag zehn und 28 in der histologischen Auswertung den Wert „0“.

In der KF-Gruppe lagen in der 10 Tage Kohorte alle Tiere bei einem Wert von „1“. Zwei Tiere wurden von der histologischen Auswertung ausgeschlossen, da der KF nicht eindeutig identifiziert werden konnte.

In der AM-Gruppe erhielten vier von fünf Tiere den Wert „1“ und ein Tier erhielt den Wert „0“ (s. Abb. 18). Es zeigte sich nach zehn Tagen ein signifikanter Unterschied zwischen der AM-Gruppe und der Kontrollgruppe ($p = 0,0235$) sowie zwischen der KF- und der Kontrollgruppe ($p = 0,0020$). Ein signifikanter Unterschied zwischen der AM- und der KF-Gruppe zeigte sich nicht ($p = 0,7219$).

Nach 28 Tagen erhielten in der KF-Gruppe drei Tiere den Wert „1“ und zwei von fünf Tiere den Wert „0“. Bei den mit AM behandelten Tieren erhielten drei den Wert „1“, eins den Wert „2“ und eins den Wert „0“ (s. Abb. 18). Es zeigte sich nach 28 Tagen histologisch ein signifikanter Unterschied zwischen der AM- und der Kontrollgruppe hinsichtlich der Inflammation ($p = 0,0020$). Ein signifikanter Unterschied zwischen der KF- und der Kontrollgruppe zeigte sich nicht ($p = 0,0716$), ebenso bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der AM- und der KF-Gruppe ($p = 0,0867$). Insgesamt zeigten alle Augen gruppenübergreifend maximal eine milde Entzündungsreaktion. Der höchste vergebene Scorewert betrug „2“ von möglichen „4“ und beschreibt damit „wenige lokale Entzündungszellen“ (s. Abb. 9). Dabei handelte es sich zumeist um Lymphozyten, gelegentlich auch um Plasmazellen oder Granulozyten in geringer Zahl.

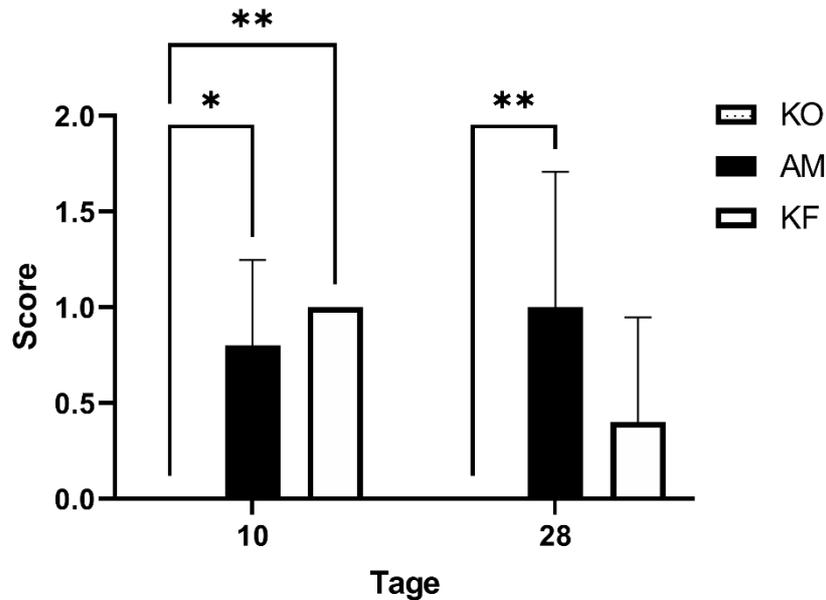


Abb. 18 **Inflammation in der histologischen Auswertung**, KO=Kontrollgruppe, AM=AM-Gruppe KF=KF-Gruppe, Score=Mittelwerte der Scorewerte des Histologiescores der Versuchsgruppen, $p < 0,05 = *$, $p < 0,005 = **$

3.3 Epithelialisierung der Keratinfilm

Nach zehn Tagen konnte bei allen Tieren der AM-Gruppe ein Transplantat histologisch identifiziert werden. In der Gruppe der KF konnte die Histologie nur bei drei von fünf Tieren ausgewertet werden, da zwei Implantate während der histologischen Aufarbeitung verloren gingen. Bei den drei Tieren, bei denen der KF identifiziert werden konnte, zeigte die HE-Färbung ein mehrschichtiges Epithel, welches das Implantat bedeckte (s. Abb. 19). Das Epithel lag ohne Spaltbildung dem KF an, was als gute Adhäsion gedeutet werden kann. Eine Migration von Keratozyten in den KF war nicht erkennbar. Im Gegensatz zur AM-Gruppe zeigte sich bei den mit KF behandelten Augen keine hornhauttypische Epithelschichtung mit basal kuboiderer und nach apikal abflachender Zellmorphologie.

Es bildete sich zwar ein mehrschichtiges Epithel, eine geordnete physiologische Schichtung und Orientierung der Zellen bestand aber nicht.

Nach 28 Tagen waren bei allen Tieren in der AM-Gruppe und auch in der KF-Gruppe Reste der Implantate erkennbar. Die Integrität der Keratinfilm- als auch der Amnionmembranimplantate war jedoch bei allen Tieren aufgehoben. In allen Fällen

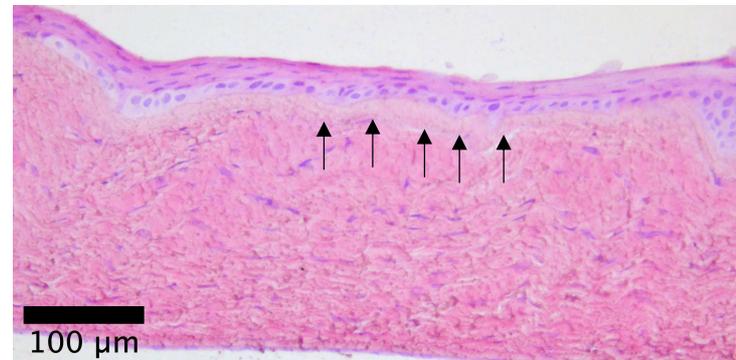
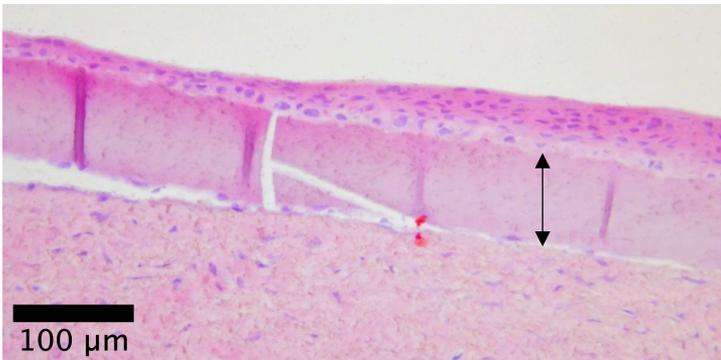
einer Amnionmembranimplantation zeigte sich oberhalb des Transplantates ein Epithel mit nahezu physiologischer Zellmorphologie und Schichtung. Die Histologie der Keratinfilmimplantate zeigte hingegen weiterhin ein mehrschichtiges Epithel, dessen Zellen in ihrer Morphologie den kornealen Stachel- und Plattenepithelzellen ähneln, eine geordnete physiologische Schichtung der Zellen bestand aber auch nach 28 Tagen nicht.

In allen Fällen lag das Epithel eng dem Keratinfilm oder den nur noch fragmentarisch erhaltenen Amnionmembranimplantaten an.

Keratinfilm

Amnionmembran

10 Tage post OP



28 Tage post OP

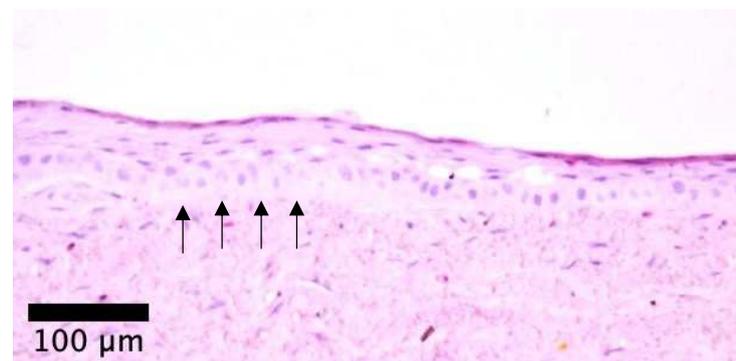
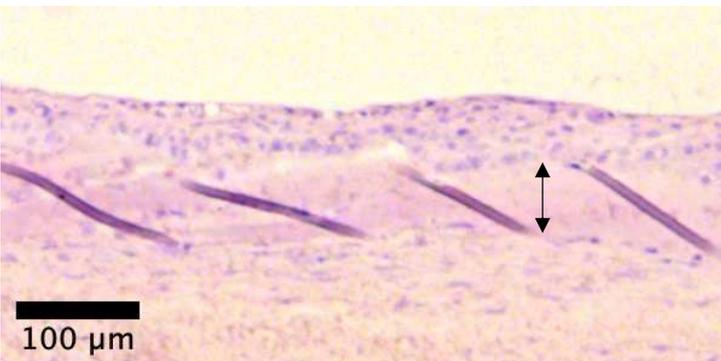


Abb. 19 **Histologische Darstellung** der KF (Doppelpfeil) und der AM (Pfeile) in HE-Färbung.

4 Diskussion

Die vorliegende Studie untersucht die Wirksamkeit von KF als Substrat für die Heilung von Hornhautepitheldefekten in einem Kaninchenmodell als Alternative zur AM.

4.1 Limitationen der Amnionmembran

Da die AM gespendetes menschliches Gewebe ist, bestehen nicht zu vernachlässigende Nachteile und Risiken bei ihrer Verwendung (35). Signifikante Konzentrationsdifferenzen für wichtige Substanzen wie den Wachstumsfaktor EGF oder den Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) konnten inter- und intraindividuell nachgewiesen werden (75,109,110).

Die AM muss bei einem geplanten Kaiserschnitt gewonnen werden und steht damit nicht unbegrenzt und meist nur in spezialisierten Zentren zur Verfügung. Unterschiedliche klinische Ergebnisse nach einer Amniontransplantation werden u.a. auf die deutlichen Unterschiede in der Beschaffenheit der AM zurückgeführt (35).

Die Präparations-, Konservierungs- und Lagerungsprozesse zur Bereitstellung der AM nehmen dabei deutlichen Einfluss auf das spätere Transplantat (82). Hinzu kommen nicht beeinflussbare interindividuelle Unterschiede und auch intraindividuell können deutliche Variationen auftreten. Zwischen zwei Spendern können Variablen wie das Alter, die Ethnie, die Dauer der Schwangerschaft, der Allgemein- und Ernährungszustand der Mutter oder das Geschlecht des Kindes Einfluss auf die Gegebenheiten der AM haben (111,112).

KF können nahezu unbegrenzt zur Verfügung gestellt werden. Mit der Gewinnung von menschlichem Keratin in Form von Haaren bei gewöhnlichen Friseursalons, steht der Rohstoff dezentral und in großer Menge zur Verfügung. Zusätzlich fällt er als Abfallprodukt in der Lebensmittelindustrie an (113,114). Die Kosten für das Rohmaterial sind folglich gering. Mit der Methode nach Shindai steht eine etablierte Extraktionsmöglichkeit zur Verfügung. Diese garantiert eine gleichbleibende Qualität des Proteins als Grundsubstanz für die KF (99).

Bei Rekonstruktionen der Augenoberfläche, insbesondere im Bereich der Hornhaut, ist die Transparenz ein entscheidender Parameter für den Erfolg des Verfahrens.

Je nach Entfernung zur Nabelschnur verändert sich intraindividuell deutlich die Dicke und Transparenz des verwendeten AM-Gewebes (69,115). Wird besonders dickes Gewebe der AM aus der Nähe der Nabelschnur verwendet, so ist dies nicht nur weniger transparent, sondern kann zu einer persistierenden subepithelialen Membran führen. Falls solch ein Membranstück chirurgisch in der optischen Achse platziert wird, kann dies zu einem für den Patienten merklichen Transparenzgeminderten Ergebnis führen (70). Über eine postoperative Kalzifikation der Hornhaut mit Transparenzminderung wurde nach Amniontransplantationen, wenn auch nur in seltenen Fällen, berichtet (116,117). Sollen KF im Bereich der Hornhaut zum Einsatz kommen, gehört zu ihren wichtigsten Eigenschaften die Transparenz. Ab Tag 21 zeigte keines der Tiere aus der KF-Gruppe noch Trübungen der Hornhaut, dies bestätigt zuvor durchgeführte Messungen der Lichttransmission, welche deutliche Vorteile des KF aufzeigten. KF erreichten Lichtdurchlässigkeitsquoten von bis zu 97 %, während eine AM maximal 70% des Lichtes bei gleicher Wellenlänge von 800 nm passieren lässt. Im unteren Bereich des sichtbaren Spektrums bei 400 nm Wellenlänge zeigen AM eine Transmissionsrate von nur 35 %, während KF noch 65 % Lichtdurchlässigkeit aufweisen (36).

Es besteht ein Infektionsrisiko für den Empfänger einer AM, durch ansteckende bakterielle oder virale Erreger im Spendergewebe. Da eine AM im Zweifel bei mehreren Empfängern eingesetzt wird, steigert sich das potenzielle Risiko einer Verbreitung (70). Aus diesem Grund besteht in vielen Ländern die Pflicht einer Lagerung vor der Verwendung, obwohl die AM theoretisch sofort nach der Lebendspende verwendet werden könnte. Nur durch einen zweiten seronegativen Test 6 Monate nach dem Kaiserschnitt, kann das Risiko einer Übertragung des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) weitestgehend ausgeschlossen werden (109). Das Testen auf diese und weitere Infektionskrankheiten wie Hepatitis oder Syphilis und die nötige Konservierung sind aufwendige und kostspielige Verfahren, die leider in weiten Teilen der Welt nicht zur Verfügung stehen (111). Bevor *in vivo* Versuche oder sogar klinische Anwendungen möglich werden, muss ein geeignetes Sterilisationsverfahren für die KF zur Verfügung stehen.

Um die bestmögliche Sterilität der KF zu gewährleisten, wurden bereits unterschiedliche Sterilisationsverfahren getestet und ihr Einfluss auf die Eigenschaften der KF untersucht.

In vitro Experimente von Borrelli et al. zeigen, dass die Plasmasterilisation, die am besten geeignete Sterilisationsmethode für die KF ist. Die Transparenz wird nicht gemindert, die Zellanhaftung- und Proliferation wird positiv beeinflusst. Die Abnahme der Elastizität und Bruchfestigkeit ist nur moderat und im akzeptablen Bereich. Andere Sterilisationsverfahren wie das Autoklavieren mindern die Transparenz oder führen wie eine Ethanolbehandlung zu steifen KF und negativen Effekten auf die Zellpopulation (36).

4.2 Andere Materialien zur Rekonstruktion der Augenoberfläche

Neben der AM findet im klinischen Alltag nur Fibrin regelmäßig Anwendung zur Rekonstruktion der Augenoberfläche (s. Kapitel 1.7.2). Es bildet, als Matrix für die Zellexpansion, die Grundlage für das Medizinprodukt Holoclar[®], vor allem weil es sich für die Kultivierung von limbalen Stammzellen und deren Transplantation bewährt hat (118). Da Fibrin aus menschlichem Blutplasma gewonnen wird, besteht jedoch theoretisch das Risiko für die Übertragung von Infektionskrankheiten und es unterliegt wie die AM aufwendigen Kontrollen (63).

Kollagen bildet neben Wasser den Hauptbestandteil der Hornhaut (119,120). Somit ist es nicht verwunderlich, dass bereits zahlreiche Studien zur Biokompatibilität von verschiedenen Kollagenen, insbesondere Kollagen Typ I für den Einsatz bei der Hornhautrekonstruktion existieren (121,122). Für Hydrogele aus Kollagen existieren mittlerweile zahlreiche Verfahren zur Modifikation ihrer Eigenschaften. Ihre Stabilität kann durch chemische oder physikalische Quervernetzung (*Cross-Linking*), durch gezielte Kompression bei der Herstellung oder durch die Beimischung weiterer Substrate wie Proteoglykane oder Chitosan gesteigert werden (123–129). Erst wenige klinische Untersuchungen wurden bis jetzt mit Kollagenmembranen als Transplantat durchgeführt (130). Patienten mit Keratokonus oder zentraler Stromanarbe zeigten in einer klinischen Studie eine Epithelialisierungsstörung in der frühen Phase nach der Transplantation und später im Bereich des Übergangs vom Transplantat zum Stroma visusreduzierende Trübungen (120). Bei Hornhautulzerationen unterschiedlicher Genese zeigten die

verwendeten Kollagenmembranen auf der Augenoberfläche eine sehr rasche Degradation, teils bevor ein Epithelschluss erfolgen konnte (124). Da das Transplantat bei ausbleibendem Epithelschluss häufig erneuert werden müsste, scheint die Anwendung auf Patienten mit reizfreien Augenoberflächen begrenzt zu bleiben. Vor allem da Kollagene auch selbst verstärkte Zellreaktionen in der Hornhaut hervorrufen können (3,131).

Mit dem Ziel zur Entwicklung einer Biomatrix, die der Kollagenstruktur des Stromas ähnelt, aber dennoch eine gute Zellverträglichkeit aufweist, wurde in der jüngeren Vergangenheit eine PGS-/PCL-Nanofasermatrix entwickelt. Die Matrix, auf der bereits korneales Zellwachstum nachgewiesen werden konnte, wird aus einem Gemisch aus Polyglycerolsebazinsäure (PGS) und Poly- ϵ -Caprolakton (PCL) mittels Elektrospinnen hergestellt. Elektrospinnen ist die einzige bekannte Technik, die es ermöglicht, Endlofasern mit Durchmessern im Nanobereich herzustellen. (132,133). Bis jetzt werden die Matrix und ihr Herstellungsverfahren vor einem möglichen klinischen Einsatz noch im Labor optimiert.

Lawrence et al. postulierten die Möglichkeit, aus Seide hergestellte Matrix als Wachstumsunterlage für Fibroblasten der Hornhaut zu verwenden. Seide besteht aus dem Faserprotein Fibroin, dieses bildet den Hauptbestandteil des Kokons der Raupe des domestizierten Seidenspinnerschmetterlings (*Bombyx mori*). Das Fibroin kann in transparente Biofilme gegossen werden, bevor eine Zellaussaat erfolgt (134). Die Proliferation von kornealen Epithelzellen und deren Adhäsion auf einer Fibroin-Unterlage konnte ebenfalls gezeigt werden (135). Die Wachstumsraten waren allerdings innerhalb der ersten 72 h signifikant geringer im Vergleich zur AM und die Produktion von Biofilmen aus Seide ist im Vergleich zu synthetischen Materialien deutlich teurer (136,137).

Im Rahmen eines europaweiten Projektes wird die dezellularisierte Schuppe des Tilapia-Fisches (*Oreochromis mossambicus*) als Matrix zur Hornhautrekonstruktion untersucht. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, die Matrix operativ als Hornhauttransplantat zu verwenden. Analysen zur Häm- und Lymphangiogenese zeigten allerdings, dass diese ähnlich stark ausgeprägt sind wie bei anderen allogenen Hornhauttransplantaten. Zudem ist ein aufwendiges Verfahren nötig, um die Schuppe des Fisches aufzuarbeiten und das Risiko für die Übertragung von Krankheitserregern zu minimieren (138).

4.3 Keratin, ein universelles Biomaterial?

Keratine werden seit Jahrzehnten als Biomaterialien verwendet und wurden in zahlreichen biomedizinischen Anwendungen untersucht.

Erste Hinweise auf eine möglicherweise erfolgreiche Anwendbarkeit zur Wiederherstellung der Augenoberflächenintegrität lieferten Studien verschiedener Fachdisziplinen.

Bei Brandwunden konnten Loan et al. zeigen, dass Keratinprodukte als Wundaufgabe die Wundheilung unter minimaler Narbenbildung, bei guter Toleranz hinsichtlich der Schmerzen und des Juckreizes fördern (139). Auch im Falle von chronischen, gefäßbedingten Beinulzerationen oder bei Patienten mit Wunden als Folge einer Epidermolysis bullosa Erkrankung, konnten keratinbasierte Medizinprodukte die Wundsituation signifikant verbessern (140,141). Durch ein vermehrtes Ausnutzen der schnelleren Epithelialisierungsrate von Wunden mit der Hilfe von Keratin-Biomaterialien, im Vergleich zu den üblichen Polyurethan-Wundverbänden, könnten hohe Kosten im Gesundheitssystem und Komplikationen für die Patienten vermieden werden (142).

Da eingesetztes Keratinmaterial im Bereich der Augenoberfläche stets in Kontakt mit Flüssigkeit wie dem Tränenfilm steht, ergeben sich aus dem Versuch mittels Keratins die menschliche Nagelplatte zu ersetzen relevante Erkenntnisse. Eine Folie aus menschlichem Haarkeratin zeigte eine vielversprechende mechanische Stabilität, bei guter Beständigkeit gegenüber Wasser (143).

Neurotrophe Erkrankungen können die Grundlage für schwerwiegende Augenoberflächenstörungen bilden. Biomaterialien im Bereich der Hornhaut sollten daher keine Neurotoxizität aufweisen und im besten Falle die Nervenregeneration unterstützen. Dies können Keratinhydrogele als Füllmaterial für röhrenförmige Nervenkanäle, sogenannte *Conduits*. Sierpinski et al. und Apel et al. konnten in einem Nervenverletzungsmodell bei Mäusen aufzeigen, dass keratinbasierte Hydrogele neuroinduktiv sind und die neurale Axonregeneration als provisorische Matrix erleichtern, welche keine schädliche Entzündungsreaktion auslöst (144,145). Keratine aus menschlichen Haaren verstärken die Aktivität von Schwann-Zellen, indem sie deren zelluläre Proliferation und Migration induzieren sowie die Expression spezifischer Gene hochregulieren (144–146). Das

Keratinhydrogel befüllte Conduits eine gleichwertige funktionelle Erholung ermöglichen, ähnlich zum etablierten Verfahren der sensorischen Nervenautotransplantation, zeigten Pace et al. in einem Kaninchen- und Mausmodell (146).

Die Menge an erfolgreichen Anwendungen in vielfältigen Bereichen der regenerativen Medizin legt nahe, dass Keratin die zahlreichen Anforderungen, welche an ein Biomaterial zur Rekonstruktion der Augenoberfläche gestellt werden, erfüllt.

4.4 Grundlage des Erfolges - die Eigenschaften des Keratins als Biomaterial

In den meisten Fällen ist die wichtigste Voraussetzung für die gewünschte Biokompatibilität eines Medizinproduktes, die Fähigkeit möglichst lange mit dem Empfängergewebe in Kontakt bleiben zu können, ohne diesem zu schaden.

Neben diesen so genannten inerten Eigenschaften, können je nach Anwendung spezifische und direkte Wechselwirkungen zwischen dem Material und den Gewebekomponenten als biologische Aktivität erwünscht sein (147). In dem von uns durchgeführten Versuch konnte gezeigt werden, dass die verwendeten KF auch nach 28 Tagen noch im Gewebe nachweisbar waren und dies bei nur sehr geringen Entzündungszeichen.

Ähnliches postulierten Fearing et al. 2014 über die Modulation von Makrophagenphänotypen durch Keratin mittels antiinflammatorischer Zytokine (148). Der M1-Phänotyp der Makrophagen gilt als entzündungsfördernd und seine Aktivität steht im Zusammenhang mit einer Gewebeerstörung, während der M2-Phänotyp als entzündungshemmend gilt und den Gewebeumbau fördert (149). Eine M2-dominierte Reaktion wurde durch das Keratin unterstützt und die Differenzierung von M1-Phänotypen der Makrophagen herunterreguliert. Die Verwendung von Keratin-Biomaterialien kann daher den zusätzlichen Nutzen einer günstigen Geweberegeneration mit sich bringen (148,149).

Weitere Untersuchungen zur Biokompatibilität von Fujii et al. zeigen, dass Keratin aus menschlichen Haaren und Nägeln eine Hemmwirkung auf die IgE-Rezeptor-stimulierte Histaminfreisetzung hat (150).

Um das Potenzial von Keratin als Biomaterial für vielseitige biomedizinische Anwendungen zu demonstrieren, wiesen Yamauchi et al. in einem Mausmodell

nach, dass KF subkutan eingebettet, keine entzündlichen oder immunologischen Reaktionen hervorrufen. Durch eine spätere Modifikation des Keratins konnte die Zelladhäsion des Keratins erhöht und damit die biologische Aktivität des Keratins wie gewünscht gesteigert werden (151,152).

Unsere Ergebnisse zeigen dazu passend, in der Nachbeobachtung von 10 Tagen, dass die Hornhäute, denen ein KF implantiert wurde, anders als diejenigen mit einer AM-Implantation, keinen Epitheldefekt mehr und keine Neovaskularisation aufweisen. Zu berücksichtigen ist, dass die AM vernäht wurde, wodurch zusätzliches Fremdmaterial in das Gewebe eingebracht wurde. Es kann somit von einem etwas größeren operativen Trauma ausgegangen werden. Dies könnte die Neovaskularisationen, insbesondere im Falle des gelockerten Fadens, in den AM-Gruppen erklären, obwohl die AM antiangiogen wirkt (79).

Ahmt ein Biomaterial die Funktion der Extrazellulärmatrix des Gewebes nach, so kann es die Funktion des Gewebes erhalten, verbessern oder sogar in einem Wundheilungsprozess die Wiederherstellung unterstützen. Die in unserem Versuch verwendeten KF ermöglichen in beiden Kohorten, den Tieren der Gruppe, das Ziel eines geschlossenen Epithels zu erreichen. Ein erneuter Defekt, als Rezidiv bei zuvor geschlossener Hornhautoberfläche, zeigt sich in den KF-Gruppen zu keinem Zeitpunkt. In der 28 Tage Kohorte zeigt sich in der AM-Gruppe bei zwei Tieren ein Epitheldefekt als Rezidiv bei zuvor geschlossener Epithelschicht. Obwohl die AM die epitheliale Wundheilung fördert, zeigen sich auch im klinischen Alltag, ähnlich wie in unserem Versuch Rezidive von Epitheldefekten (153). Die AM bleibt zwar, wenn einmal in das Gewebe integriert für Monate oder sogar Jahre nachweisbar. Ihre besonderen wundheilungsfördernden Faktoren entstammen allerdings den, durch die Kryokonservierung devitalisierten Zellen, so dass eine langfristige Verwendung problematisch ist (67).

Insbesondere Proteine wie das Keratin werden aufgrund der sich langfristig zeigenden Fähigkeit als Extrazellulärmatrix zu fungieren, welche die Zell-Zell- und die Zell-Matrix-Interaktion dauerhaft fördert, bei der Biomaterialproduktion in hohem Maße berücksichtigt (154). Unterstützend weisen menschliche Haarproteine die Zelladhäsions-Aminosäuresequenz LDV auf. Diese wird von dem Protein $\alpha 4\beta 1$ der Integrinproteinfamilie, welches sich auf Zellmembranen wiederfindet, erkannt. Die Oberfläche wird auf diese Weise adhäsiv für Zellen (114).

KF können unter anderem wegen dieser Eigenschaften erfolgreich als Gerüst für die Zellkultivierung verwendet werden. Die durchgeführten Versuche bestätigen ebenfalls die für einen Epithelverschluss entscheidenden Eigenschaften des Keratins. Hier zeigen sowohl tierische Zellen wie Mausfibroblasten, als auch humane korneale Epithelzelllinien eine feste Zelladhäsion und gute Proliferationsraten (93,98,155–157).

Bereits 1998 wurde Keratin aufgrund des guten Zellkultivierungsergebnisses von Fibroblasten ein hohes Potenzial als Biomaterial zugeschrieben (158). Tachibana et al. stellten 2002 Keratingerüste für die langfristige Zellkultivierung her. Diese erwiesen sich für die Kultivierung von Zellen mit hoher Dichte als bessere Alternative zu Kollagenen (155). Verma et al. produzierten Gerüste aus menschlichen Haarproteinen und bewiesen, dass diese in der Lage sind, Zell-Zell-Kontakte und Zell-Matrix-Kontakte zu verbessern und eine langfristige Zellkultur zu unterstützen (114). Beide Kohorten dieses Versuches bestätigten die epitheliale Wundheilung der Hornhaut in der KF-Gruppe und damit eine funktionierende Interaktion zwischen kornealen Epithelzellen und dem KF.

4.5 Keratinfilme für die Rekonstruktion der Augenoberfläche

Auf Keratinbasis hergestellte Biofilme zur biomedizinischen Anwendung sind in der Vergangenheit durch zahlreiche unterschiedliche Methoden und mit unterschiedlichsten Eigenschaften hergestellt worden (157,159–164).

Die KF sollten, wie die AM, mit Eigenschaften wie angemessener Flexibilität und Stabilität aufwarten, auch um bei Operationen komplikationsarm handhabbar zu sein.

Die größten Modifizierungen in der Biomechanik werden über die Variation der Filmkomposition, wie beispielsweise eine Erhöhung des Anteils an alkalischem Dialysat, erzielt. Je nach Verhältnis von wässrigem zu alkalischem Dialysat weisen die KF unterschiedliche biomechanische Eigenschaften auf. In früheren Untersuchungen wurden KF mit diversen Zusammensetzungen auf ihre Elastizität und Bruchfestigkeit untersucht und miteinander verglichen. Beide Parameter nehmen mit steigendem Anteil an alkalischem Dialysat ab (93).

Die hier verwendeten KF 90/10 zeigten in einer chirurgischen *ex vivo* Machbarkeitsstudie den besten Kompromiss zwischen mechanischer Festigkeit und Flexibilität bei guter Transparenz (36).

Diese KF mit einem alkalischen Dialysatanteil von 10 % weisen vergleichbare Materialeigenschaften, im Hinblick auf die elastische Verformbarkeit und die Reißfestigkeit, wie eine AM auf (93).

Die benötigte Operationszeit unterschied sich daher im *ex vivo* Versuch auch nicht signifikant von der Operationszeit, die für die Nahtfixation einer AM benötigt wurde. Trotzdem erlaubte die höhere Rate an gelockerten Fäden bei den KF im Vergleich zur AM die Schlussfolgerung, dass eine alternative, nahtfreie chirurgische Technik für *in vivo* Experimente geeigneter sein könnte, auch weil eine weitere Anpassung der KF nicht vielversprechend zu sein scheint (36). Änderungen in der KF-Zusammensetzung, wie ein höherer Glycerolanteil, gefolgt von einer notwendigen längeren Trocknungszeit führen zu einer Abnahme der Proliferation und Anhaftung von kornealen Epithelzellen (93).

Versuche die KF über eine Anpassung des alkalischen Dialysatanteils zu optimieren scheiterten ebenfalls. Ab einem Anteil von 30 % sind die Filme für biomechanische Untersuchungen zu fragil und nicht mehr verwendbar. Zusätzlich mindert der alkalische Dialysatanteil durch seinen höheren Melaninanteil die Transparenz (93). KF aus 100 % wässrigem Dialysat (KF 100) zeigen zwar die höchsten Werte im Elastizitäts- und Bruchfestigkeitstest, allerdings sind die KF 100 zu rigide, um sich bei der Anpassung an die gewölbte Hornhautoberfläche zu verformen (36).

Diesen Erkenntnissen folgend wurden die KF, anders als die AM in diesem Versuch, nicht vernäht. In der 10 Tage Kohorte konnte bei 2/5 Tieren in der Histologie kein KF nachgewiesen werden. Ursache ist ein Verlust des Transplantates während der postmortalen Manipulation vor dem Einbettungsverfahren. Dennoch zeigt der Befund, dass eine nahtfreie Fixation das höhere Risiko eines Transplantatverlustes birgt.

Reichl konnte 2009 nachweisen, dass der KF ein vielversprechendes Substrat für die Kultivierung von 12 unterschiedlichen Zelllinien ist, u. a. für epitheliale, stromale und endotheliale humane Hornhautzellen (113). Im Jahre 2011 konnte er darüber hinaus zeigen, dass KF im *in vitro* Versuch die Proliferation von menschlichen

kornealen Epithelzellen unterstützen, indem er ähnliche Populationsverdopplungszeiten wie bei einer AM demonstrierte (93).

Im vorliegenden *in vivo* Modell des Kaninchens zeigte sich bereits an Tag sieben der 10 Tage Kohorte bei allen Tieren mit einem KF ein kompletter Epithelschluss, während in der AM-Gruppe erst bei 3/5 Tieren das Epithel geschlossen war. Damit bestand zu diesem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen der AM- und der KF-Gruppe im Hinblick auf den Prozess der epithelialen Wundheilung zu Gunsten des KF. In der 28 Tage Kohorte zeigt sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen der AM- und der KF-Gruppe, dennoch war ab Tag 21 stets bei mehr Tieren mit einem KF ein geschlossenes Epithel nachweisbar. Dies bestätigt die Ergebnisse eines *in vitro* Wundheilungsmodells in Form eines „*scratch-assays*“ von Feng et al. 2014, bei dem die erfolgreiche Zellproliferation und -migration von humanen Hornhautepithelzellen auf einem KF demonstriert wurde. Die auf KF kultivierten Zellen zeigten nach 12 h, 24 h und 36 h eine signifikant kleinere freie Wundfläche im Vergleich zur AM (165).

In unserer histologischen Auswertung zeigte das Epithel auf den AM allerdings eine physiologischere Morphologie als auf den KF. Hier zeigt sich wie bereits zuvor beschrieben, dass die AM durch die Sezernierung des epithelialen Wachstumsfaktors (EGF), des Hepatozytenwachstumsfaktors (HGF) und des Keratinozytenwachstumsfaktors (KGF) die Proliferation und Differenzierung der Epithelzellen fördert (75). Durch die große Ähnlichkeit des Kollagenaufbaus der Basalmembran der AM und der Hornhaut entsteht zudem eine gute Leitstruktur für das Wachstum, die Adhäsion und die Differenzierung von kornealen Epithelzellen (73,74). In unserem Versuch lag in allen Fällen das Epithel eng dem Keratinfilm oder den nur noch fragmentarisch erhaltenen Amnionmembranimplantaten an, was für eine gute Adhäsion bei beiden Implantaten spricht.

Die hier vorgelegten klinischen und histologischen Ergebnisse bestätigen die Erkenntnisse der ersten *in vivo* Untersuchungen am Kaninchen-Modell aus dem Jahre 2015, bei dem die KF jedoch in das tiefe Stroma der Hornhaut implantiert wurden. Damals wie heute konnte die gute Hornhautgewebekompatibilität mit insgesamt geringer inflammatorischer Reaktion des Kaninchenwirtsgewebes gezeigt werden. In beiden Versuchsmodellen war es möglich, die Hornhauttransparenz zu erhalten, welche eine Schlüsselrolle in der visuellen

Rehabilitation innehat (108). Nach 21 Tagen wies keines der mit einem Keratinfilm behandelten Augen mehr eine Transparenzminderung auf. Ab diesem Zeitpunkt und auch bei Versuchsende nach 28 Tagen zeigte die AM-Gruppe die am wenigsten transparenten Hornhäute.

Die Abwesenheit von Makrophagen in der histologischen Aufbereitung lässt darauf schließen, dass die Keratinfilm einen unterstützenden milden Entzündungsprozess ohne Fibrose induzieren und eine gute Abbaubarkeit aufweisen (108,148,166). Das histologische Ergebnis insgesamt weist eine milde Entzündungsreaktion nach, ohne signifikante Unterschiede zwischen der AM- und der KF-Gruppe. Die Ergebnisse zeigen das Potenzial des KF als alternatives Biomaterial zur Rekonstruktion der Augenoberfläche.

4.6 Einschränkungen dieser Arbeit

Um die Ergebnisse richtig interpretieren zu können, muss berücksichtigt werden, dass das Kaninchenauge generell empfindlicher auf Biomaterialien reagiert als das menschliche Auge (167). Die Hornhaut des Kaninchens ist dünner und das Kaninchenauge reagiert mit einer stärkeren immunologischen Gewebereaktion auch auf kleine chirurgische Eingriffe, Fremdmaterialien, Medikamente oder Chemikalien (168).

In diesem ersten *in vivo* Experiment zur Wundheilung wurden die KF peripher in einer intrastromalen Tasche durch die darüber gelegene Stromalamelle fixiert, während die AM vernäht wurde. Damit wurde den Erkenntnissen aus der *ex-vivo* Machbarkeitsstudie Rechnung getragen, welche eine erhöhte Rate an gelockerten Fäden bei den KF gezeigt hatte (36). Durch die verschiedenen operativen Fixierungsmethode war in der AM-Gruppe das Risiko einer Neovaskularisation erhöht, während in der KF-Gruppe das Risiko des Transplantatverlustes erhöht war. Am Ende des Versuches in der 10 Tage Kohorte konnten schließlich zwei KF nicht in der Histologie nachgewiesen werden. Wegen des Verlustes des Transplantates bei der postmortalen Manipulation, mussten diese zwei Augen von der histologischen Auswertung ausgeschlossen werden. Alle nahtfixierten Transplantate der AM-Gruppe konnten in der Histologie identifiziert werden, dafür zeigte ein Tier bei Versuchsende eine Neovaskularisation, am ehesten aufgrund eines gelockerten Fadens.

In zukünftigen Studien könnte es von Vorteil sein, die Operation und den Wundheilungsprozess zusätzlich mittels optischer Kohärenztomographie zu dokumentieren. Die Lage der Transplantate könnte kontrolliert und ihre Degradation im zeitlichen Verlauf gemessen werden (169–173).

Außerdem wäre es sinnvoll, die Methode zur Extraktion von Keratin bzgl. Aufwand und Kosten zu optimieren. Die im Jahre 2022 erstmalig erfolgte Inkorporation von Dexamethason und damit die erfolgreiche Etablierung wirkstoffbeladener KF könnte zukünftig die biochemischen Eigenschaften der KF optimieren und die Therapiemöglichkeiten der KF potenzieren (174).

4.7 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse bestätigen die Resultate aus dem *in vitro* Wundheilungsassay mit humanen kornealen Epithelzellen von Feng et al. (2014) und aus dem *in vivo* Modell von Borrelli et al. (2015), dass KF den Verschluss eines Epitheldefektes fördern, dabei keine starke Entzündungsreaktion im Hornhautgewebe induzieren und eine transparenzerhaltende Geweberegeneration ohne Narbenbildung ermöglichen.

Es konnte in diesem *in vivo* Modell gezeigt werden, dass KF erfolgreich zur Rekonstruktion der Augenoberfläche implantiert werden können. Die Reepithelialisierung bei gleichzeitigem Erhalt der Hornhauttransparenz wird ermöglicht. Basierend auf den derzeitigen Kenntnissen zur Interaktion zwischen Empfängerhornhaut und KF sowie der biologischen Funktion als extrazelluläre Matrix, scheint Keratin als potenzielles Biomaterial für die Rekonstruktion der Augenoberfläche vielversprechend zu sein. Die Mechanismen und die zugrundeliegende Biologie der Wechselwirkungen zwischen dem kornealen Epithel und dem Stroma des Empfängers sowie dem KF müssen jedoch weiter untersucht werden. Eine Optimierung der operativen Fixation der KF im Bereich der Hornhaut als Transplantat sollte erfolgen, um einen ungewollten Transplantatverlust zu vermeiden, bevor eine Anwendung am Menschen erwogen werden kann.

5 Literaturverzeichnis

1. Kruse FE, Cursiefen C, Seitz B, Völcker HE, Naumann GOH, Holbach L. Klassifikation der erkrankungen der augenoberfläche. Teil I. Ophthalmologe. 2003;100(11):899–915.
2. Gipson IK. The ocular surface: The challenge to enable and protect vision. The Friedenwald lecture. Investig Ophthalmol Vis Sci. 2007;48(10):4391–8.
3. Fuchsluger T, Salehi S, Petsch C, Bachmann B. Neue Möglichkeiten der Augenoberflächenrekonstruktion: Membranen aus Kollagen und biokompatiblen Elastomernanofasern. Ophthalmologe. 2014;111(11):1019–26.
4. Grehn F. Augenheilkunde [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012. (Springer-Lehrbuch). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-11333-8>
5. King-Smith PE, Fink BA, Hill RM, Koelling KW, Tiffany JM. The thickness of the tear film. Curr Eye Res. 2004;29(4–5):357–68.
6. Paulsen F. Functional anatomy and immunological interactions of ocular surface and adnexa. Dev Ophthalmol. 2008;41:21–35.
7. Rolando M, Zierhut M. The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease. Surv Ophthalmol. 2001;45(SUPPL. 2):203–10.
8. Montés-Micó R. Role of the tear film in the optical quality of the human eye. J Cataract Refract Surg. 2007;33(9):1631–5.
9. Rieger G. The importance of the precorneal tear film for the quality of optical imaging. Br J Ophthalmol. 1992;76(3):157–8.
10. Klenkler B, Sheardown H, Jones L. Growth factors in the tear film: Role in tissue maintenance, wound healing, and ocular pathology. Ocul Surf. 2007;5(3):228–39.
11. Fleming A, B PRSL. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. Proc R Soc London Ser B, Contain Pap a Biol Character. 1922;93(653):306–17.
12. Flanagan JL, Willcox MDP. Role of lactoferrin in the tear film. Biochimie [Internet]. 2009;91(1):35–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2008.07.007>
13. Meek KM, Knupp C. Corneal structure and transparency. Prog Retin Eye Res

- [Internet]. 2015;49:1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.07.001>
14. Gharaee H, Abrishami M, Shafiee M, Ehsaei A. White-to-white corneal diameter: Normal values in healthy Iranian population obtained with the Orbscan II. *Int J Ophthalmol*. 2014;7(2):309–12.
 15. DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg* [Internet]. 2011;37(3):588–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrs.2010.12.037>
 16. Kaplan HJ, Niederkorn JY. Regional immunity and immune privilege. *Chem Immunol Allergy*. 2007;92:11–26.
 17. Bukowiecki A, Hos D, Cursiefen C, Eming SA. Wound-healing studies in cornea and skin: Parallels, differences and opportunities. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6):1–24.
 18. Brad Bowling. *Klinische Ophthalmologie* [Internet]. Kanski *Klinische Ophthalmologie*. Elsevier; 2017. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C2015001797X>
 19. Torricelli AAM, Wilson SE. Cellular and extracellular matrix modulation of corneal stromal opacity. *Exp Eye Res* [Internet]. 2014;129(October):151–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2014.09.013>
 20. Eghrari AO, Riazuddin SA, Gottsch JD. Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development [Internet]. 1st ed. Vol. 134, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier Inc.; 2015. 7–23 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.04.001>
 21. Gipson IK, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS. Anchoring fibrils from a complex network in human and rabbit cornea. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1987;28(2):212–20.
 22. Jacobsen IE, Jensen OA, Prause JU. STRUCTURE AND COMPOSITION OF BOWMAN'S MEMBRANE: Study by frozen resin cracking. *Acta Ophthalmol*. 1984;62(1):39–53.
 23. Komai Y, Ushiki T. The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1991;32(8):2244–58.
 24. Wilson SE. Bowman's layer in the cornea– structure and function and

- regeneration. *Exp Eye Res* [Internet]. 2020;195(April):108033. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108033>
25. Hassell JR, Birk DE. The molecular basis of corneal transparency. *Exp Eye Res* [Internet]. 2010;91(3):326–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2010.06.021>
 26. Farrell RA, Mccally RL, Johns T, Spring S. Maryland 20910,. 1973;589–612.
 27. de Oliveira RC, Wilson SE. Descemet’s membrane development, structure, function and regeneration. *Exp Eye Res* [Internet]. 2020;197(February):108090. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108090>
 28. Hanna C, Bicknell DS, O’Brien JE. Cell Turnover in the Adult Human Eye. *Arch Ophthalmol*. 1961;65(5):695–8.
 29. Davanger M, Evensen A. Role of the Pericorneal Papillary Structure in Renewal of Corneal Epithelium. *Nat Publicisinh Gr*. 1971;
 30. Biber JM, Holland EJ, Neff KD. Management of ocular stem cell disease. *Int Ophthalmol Clin*. 2010;50(3):25–34.
 31. Nowell CS, Radtke F. Corneal epithelial stem cells and their niche at a glance. *J Cell Sci*. 2017;130(6):1021–5.
 32. Jumblatt MM, Willer SS. Corneal endothelial repair: Regulation of prostaglandin E2 synthesis. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37(7):1294–301.
 33. Shortt AJ, Tuft SJ. Ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol*. 2011;95(7):901–2.
 34. Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE. Stammzellbasierte Ansätze bei Erkrankungen der Augenoberfläche. *Ophthalmologe*. 2017;114(4):296–7.
 35. Borrelli M, Witt J, Roth M, Reichl S, Bradenbrink P, Schoppe M, et al. Keratin films for ocular surface reconstruction: Wound healing in an in-vivo model. *Exp Eye Res* [Internet]. 2022;109356. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014483522004377>
 36. Borrelli M, Reichl S, Feng Y, Schargus M, Schrader S, Geerling G. In vitro characterization and ex vivo surgical evaluation of human hair keratin films in ocular surface reconstruction after sterilization processing. *J Mater Sci Mater Med*. 2013;24(1):221–30.

37. Schrader S, Notara M, Beaconsfield M, Tuft SJ, Daniels JT, Geerling G. Tissue engineering for conjunctival reconstruction: Established methods and future outlooks. *Curr Eye Res.* 2009;34(11):913–24.
38. Echevarria TJ, Di Girolamo N. Tissue-Regenerating, Vision-Restoring Corneal Epithelial Stem Cells. *Stem Cell Rev Reports.* 2011;7(2):256–68.
39. Chen JJY, Tseng SCG. Corneal epithelial wound healing in partial limbal deficiency. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1990;31(7):1301–14.
40. Bobba S, Di Girolamo N, Mills R, Daniell M, Chan E, Harkin DG, et al. Nature and incidence of severe limbal stem cell deficiency in Australia and New Zealand. *Clin Exp Ophthalmol.* 2017;45(2):174–81.
41. Holland EJ, Schwartz GS. Changing concepts in the management of severe ocular surface disease over twenty-five years. *Cornea.* 2000;19(5):688–98.
42. Kruse FE. Stem cells and corneal epithelial regeneration. *Eye.* 1994;8(2):170–83.
43. Das P, Gokani A, Bagchi K, Bhaduri G, Chaudhuri S, Law S. Limbal epithelial stem-microenvironmental alteration leads to pterygium development. *Mol Cell Biochem.* 2015;402(1–2):123–39.
44. Espana EM, Di Pascuale M, Grueterich M, Solomon A, Tseng SCG. Keratolimbal allograft in corneal reconstruction. *Eye.* 2004;18(4):406–17.
45. Hatch KM, Dana R. The structure and function of the limbal stem Cell and the disease states associated with limbal stem cell deficiency. *Int Ophthalmol Clin.* 2009;49(1):43–52.
46. Ambati BK, Nozaki M, Singh N, Takeda A, Jani PD, Suthar T, et al. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature.* 2006;443(7114):993–7.
47. Kim JC, Tseng SC. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea.* 1995 Sep;14(5):473–84.
48. Cursiefen C. Künstliche Hornhaut. *Ophthalmologe.* 2014;1008–9.
49. Matthaei M, Sandhaeger H, Hermel M, Adler W, Jun AS, Cursiefen C, et al. Changing indications in penetrating keratoplasty: A systematic review of 34 years of global reporting. *Transplantation.* 2017;101(6):1387–99.
50. Zirm EK. Eine erfolgreiche totale Keratoplastik (A successful total

- keratoplasty). 1906. *Refract Corneal Surg.* 1906;5(4):258–61.
51. Geerling G, Seitz B. Keratoplastik - Eine vereinfachte klassifikation/terminologie zur erfassung aktueller operationskonzepte. *Klin Monbl Augenheilkd.* 2005;222(8):612–4.
 52. Flockerzi E, Maier P, Böhringer D, Reinshagen H, Kruse F, Cursiefen C, et al. Trends in Corneal Transplantation from 2001 to 2016 in Germany: A Report of the DOG–Section Cornea and its Keratoplasty Registry. *Am J Ophthalmol* [Internet]. 2018;188:91–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2018.01.018>
 53. Maier P, Reinhard T, Cursiefen C. Descemet stripping endothelial keratoplasty-Rapid recovery of visual acuity. *Dtsch Arztebl Int.* 2013;110(21):365–71.
 54. Riss S, Heindl LM, Bachmann BO, Kruse FE, Cursiefen C. Pentacam-based big bubble deep anterior lamellar keratoplasty in patients with keratoconus. *Cornea.* 2012;31(6):627–32.
 55. Tseng SC, Prabhasawat P, Barton K, Gray T, Meller D. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960).* 1998 Apr;116(4):431–41.
 56. Kenyon KR, Tseng SCG. Limbal Autograft Transplantation for Ocular Surface Disorders. *Ophthalmology.* 1989;96(5):709–23.
 57. Tsai RJF, Tseng SCG. Human allograft limbal transplantation for corneal surface reconstruction. *Cornea.* 1994;13(5):389–400.
 58. Tsubota K, Toda I, Saito H, Shinozaki N, Shimazaki J. Reconstruction of the Corneal Epithelium by Limbal Allograft Transplantation for Severe Ocular Surface Disorders. *Ophthalmology.* 1995;102(10):1486–96.
 59. Jenkins C, Tuft S, Liu C, Buckley R. Limbal transplantation in the management of chronic contact-lens- associated epitheliopathy. *Eye.* 1993;7(5):629–33.
 60. Sacchetti M, Rama P, Bruscolini A, Lambiase A. Limbal stem cell transplantation: Clinical results, limits, and perspectives. *Stem Cells Int.* 2018;2018.
 61. Sangwan VS, Basu S, MacNeil S, Balasubramanian D. Simple limbal epithelial transplantation (SLET): A novel surgical technique for the treatment of

- unilateral limbal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol.* 2012;96(7):931-4.
62. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet.* 1997;349(9057):990-3.
63. Pellegrini G, Lambiase A, Macaluso C, Pocobelli A, Deng S, Cavallini GM, et al. From discovery to approval of an advanced therapy medicinal product-containing stem cells, in the EU. *Regen Med.* 2016;11(4):407-20.
64. Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, et al. Corneal Reconstruction with Tissue-Engineered Cell Sheets Composed of Autologous Oral Mucosal Epithelium. *N Engl J Med.* 2004;351(12):1187-96.
65. Satake Y, Higa K, Tsubota K, Shimazaki J. Long-term outcome of cultivated oral mucosal epithelial sheet transplantation in treatment of total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology.* 2011 Aug;118(8):1524-30.
66. Espana EM, Di Pascuale M, Grueterich M, Solomon A, Tseng SCG. Keratolimbal allograft in corneal reconstruction. *Eye (Lond).* 2004 Apr;18(4):406-17.
67. Meller D, Pauklin M, Thomasen H, Westekemper H, Steuhl K-P. Amniotic membrane transplantation in the human eye. *Dtsch Arztebl Int.* 2011 Apr;108(14):243-8.
68. Rötth De A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes. *Arch Ophthalmol.* 1940;23:522-5.
69. Bourne GL. The anatomy of the human amnion and chorion. *Proc R Soc Med.* 1966 Nov;59(11 Part 1):1127-8.
70. Dua HS, Gomes JAP, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol.* 2004;49(1):51-77.
71. Houlihan JM, Biro PA, Harper HM, Jenkinson HJ, Holmes CH. The human amnion is a site of MHC class Ib expression: evidence for the expression of HLA-E and HLA-G. *J Immunol.* 1995 Jun;154(11):5665-74.
72. Azuara-Blanco A, Pillai CT, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol.* 1999 Apr;83(4):399-402.
73. Fukuda K, Chikama T, Nakamura M, Nishida T. Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva. *Cornea.* 1999 Jan;18(1):73-9.

74. Seitz B, Resch MD, Schlötzer-Schrehardt U, Hofmann-Rummelt C, Sauer R, Kruse FE. Histopathology and ultrastructure of human corneas after amniotic membrane transplantation. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)*. 2006 Oct;124(10):1487–90.
75. Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, Fullwood NJ, Quantock AJ, Kinoshita S. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res*. 2000 Mar;20(3):173–7.
76. Touhami A, Grueterich M, Tseng SCG. The role of NGF signaling in human limbal epithelium expanded by amniotic membrane culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002 Apr;43(4):987–94.
77. Schroeder A, Theiss C, Steuhl K-P, Meller K, Meller D. Effects of the human amniotic membrane on axonal outgrowth of dorsal root ganglia neurons in culture. *Curr Eye Res*. 2007 Sep;32(9):731–8.
78. Lee SB, Li DQ, Tan DT, Meller DC, Tseng SC. Suppression of TGF-beta signaling in both normal conjunctival fibroblasts and pterygial body fibroblasts by amniotic membrane. *Curr Eye Res*. 2000 Apr;20(4):325–34.
79. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea*. 2000 May;19(3):348–52.
80. Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SC. Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol*. 2001 Apr;85(4):444–9.
81. Liu T, Zhai H, Xu Y, Dong Y, Sun Y, Zang X, et al. Amniotic membrane traps and induces apoptosis of inflammatory cells in ocular surface chemical burn. *Mol Vis*. 2012;18:2137–46.
82. Kruse FE, Jousen AM, Rohrschneider K, You L, Sinn B, Baumann J, et al. Cryopreserved human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2000 Jan;238(1):68–75.
83. Thomasen H, Pauklin M, Noelle B, Geerling G, Vetter J, Steven P, et al. The effect of long-term storage on the biological and histological properties of cryopreserved amniotic membrane. *Curr Eye Res*. 2011;36(3):247–55.
84. Kruse FE, Rohrschneider K, Völcker HE. Multilayer amniotic membrane

- transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. *Ophthalmology*. 1999 Aug;106(8):1504–10; discussion 1511.
85. Lee SH, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol* [Internet]. 1997;123(3):303–12. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9394\(14\)70125-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9394(14)70125-4)
 86. Said DG, Nubile M, Alomar T, Hopkinson A, Gray T, Lowe J, et al. Histologic features of transplanted amniotic membrane: implications for corneal wound healing. *Ophthalmology*. 2009 Jul;116(7):1287–95.
 87. Gris O, Wolley-Dod C, Güell JL, Tresserra F, Lerma E, Corcostegui B, et al. Histologic findings after amniotic membrane graft in the human cornea. *Ophthalmology*. 2002 Mar;109(3):508–12.
 88. Sabater AL, Perez VL. Amniotic membrane use for management of corneal limbal stem cell deficiency. *Curr Opin Ophthalmol*. 2017;28(4):363–9.
 89. Dua HS, Miri A, Elalfy MS, Lencova A, Said DG. Amnion-assisted conjunctival epithelial redirection in limbal stem cell grafting. *Br J Ophthalmol*. 2017;101(7):913–9.
 90. Stachon T, Bischoff M, Seitz B, Huber M, Zawada M, Langenbacher A, et al. [Growth Factors and Interleukins in Amniotic Membrane Tissue Homogenate]. *Klin Monbl Augenheilkd*. 2015 Jul;232(7):858–62.
 91. Lee H, Noh K, Lee SC, Kwon IK, Han DW, Lee IS, et al. Human hair keratin and its-based biomaterials for biomedical applications. *Tissue Eng Regen Med*. 2014;11(4):255–65.
 92. Alonso L, Fuchs E. The hair cycle. *J Cell Sci*. 2006;119(3):391–3.
 93. Reichl S, Borrelli M, Geerling G. Keratin films for ocular surface reconstruction. *Biomaterials*. 2015;32(13):3375–86.
 94. Wang B, Yang W, McKittrick J, Meyers MA. Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Prog Mater Sci* [Internet]. 2016;76:229–318. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmatsci.2015.06.001>
 95. Coulombe PA, Omary MB. “Hard” and “soft” principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol*. 2002;14(1):110–22.

96. Toivola DM, Baribault H, Magin T, Michie SA, Omary MB. Simple epithelial keratins are dispensable for cytoprotection in two pancreatitis models. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2000;279(6 42-6):1343–54.
97. Patrucco A, Visai L, Fassina L, Magenes G, Tonin C. Keratin-based matrices from wool fibers and human hair [Internet]. *Materials for Biomedical Engineering: Biopolymer Fibers*. Elsevier Inc.; 2019. 375–403 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-816872-1.00013-3>
98. Hill P, Brantley H, Van Dyke M. Some properties of keratin biomaterials: kerateines. *Biomaterials*. 2010 Feb;31(4):585–93.
99. Nakamura AN, Rimoto MA, Akeuchi KT, Ujii TF. The protein content in a keratinized structure. 2002;25(May):569–72.
100. Maclaren JA. Maximum Extraction of Wool Proteins by Thiol-Urea Solutions. *Text Res J*. 1987;57(2):87–92.
101. Reichl S, Borrelli M, Geerling G. Keratin films for ocular surface reconstruction. *Biomaterials*. 2011;32(13):3375–86.
102. Tseng SCG, Prabhasawat P, Lee SH. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am J Ophthalmol* [Internet]. 1997;124(6):765–74. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9394\(14\)71693-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9394(14)71693-9)
103. Borrelli M, Feng Y, Spaniol K, Geerling G, Schrader S. New Developments in Matrices for Ocular Surface Reconstruction. *Curr Tissue Eng*. 2012;1(1):30–5.
104. Sitalakshmi G, Sudha B, Madhavan HN, Vinay S, Krishnakumar S, Mori Y, et al. Ex vivo cultivation of corneal limbal epithelial cells in a thermoreversible polymer (Mebiol Gel) and their transplantation in rabbits: An animal model. *Tissue Eng - Part A*. 2009;
105. Technovit I. Gebrauchsinformation Technovit 8100. Available from: https://www.google.de/search?q=technovit+8100+protocol&sxsrf=ALeKk02h5mcyumZQuKDSX8N_47JZrM94sQ%3A1618670031639&source=hp&ei=z_F6YOKNJeCMjLsP1c2ZiAU&iflsig=AINFCbYAAAAAYHr_39I70IPk10ydc3Ua bL9axkZ6lPaM&oq=technovit+8100&gs_lcp=Cgdnd3Mtd2l6EAMYATICCAAy BggAE
106. Irvine AR, Kimura SJ. Experimental stromal herpes simplex keratitis in rabbits. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1967;65(5):189–210.

107. Chang E, Galle L, Maggs D, Estes DM, Mitchell WJ. Pathogenesis of Herpes Simplex Virus Type 1-Induced Corneal Inflammation in Perforin-Deficient Mice. *J Virol*. 2000;74(24):11832–40.
108. Borrelli M, Joepen N, Reichl S, Finis D, Schoppe M, Geerling G, et al. Keratin films for ocular surface reconstruction: Evaluation of biocompatibility in an in-vivo model. *Biomaterials* [Internet]. 2015;42:112–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.11.038>
109. Gicquel J-J, Dua HS, Brodie A, Mohammed I, Suleman H, Lazutina E, et al. Epidermal growth factor variations in amniotic membrane used for ex vivo tissue constructs. *Tissue Eng Part A*. 2009 Aug;15(8):1919–27.
110. Hopkinson A, McIntosh RS, Tighe PJ, James DK, Dua HS. Amniotic membrane for ocular surface reconstruction: donor variations and the effect of handling on TGF-beta content. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Oct;47(10):4316–22.
111. Dua HS, Rahman I, Miri A, Said DG. Variations in amniotic membrane: relevance for clinical applications. Vol. 94, *The British journal of ophthalmology*. England; 2010. p. 963–4.
112. López-Valladares MJ, Teresa Rodríguez-Ares M, Touriño R, Gude F, Teresa Silva M, Couceiro J. Donor age and gestational age influence on growth factor levels in human amniotic membrane. *Acta Ophthalmol*. 2010;88(6):211–6.
113. Reichl S. Films based on human hair keratin as substrates for cell culture and tissue engineering. *Biomaterials* [Internet]. 2009;30(36):6854–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.08.051>
114. Verma V, Verma P, Ray P, Ray AR. Preparation of scaffolds from human hair proteins for tissue-engineering applications. *Biomed Mater*. 2008 Jun;3(2):25007.
115. Cannon CJ, Douth J, Chen B, Hopkinson A, Mehta JS, Nakamura T, et al. The variation in transparency of amniotic membrane used in ocular surface regeneration. *Br J Ophthalmol*. 2010 Aug;94(8):1057–61.
116. Anderson SB, de Souza RF, Hofmann-Rummelt C, Seitz B. Corneal calcification after amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol*. 2003 May;87(5):587–91.
117. Messmer EM. Hypopyon after amniotic membrane transplantation. Vol. 108, *Ophthalmology*. United States; 2001. p. 1714–5.

118. Rama P, Bonini S, Lambiase A, Golisano O, Paterna P, De Luca M, et al. Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation*. 2001 Nov;72(9):1478–85.
119. Maurice DM. The structure and transparency of the cornea. *J Physiol*. 1957;136(2):263–86.
120. Fagerholm P, Lagali NS, Merrett K, Jackson WB, Munger R, Liu Y, et al. A biosynthetic alternative to human donor tissue for inducing corneal regeneration: 24-month follow-up of a phase 1 clinical study. *Sci Transl Med*. 2010 Aug;2(46):1–8.
121. Geggel HS, Friend J, Thoft RA. Collagen gel for ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1985 Jun;26(6):901–5.
122. Dunn MW, Nishihara T, Stenzel KH, Branwood AW, Rubin AL. Collagen-derived membrane: corneal implantation. *Science*. 1967 Sep;157(3794):1329–30.
123. Duan X, McLaughlin C, Griffith M, Sheardown H. Biofunctionalization of collagen for improved biological response: Scaffolds for corneal tissue engineering. *Biomaterials*. 2007;28(1):78–88.
124. Petsch C. Semisynthetische Kollagenmembranen zur Rekonstruktion und Regeneration der Augenoberfläche. 2014;108.
125. Mi S, Chen B, Wright B, Cannon CJ. Plastic compression of a collagen gel forms a much improved scaffold for ocular surface tissue engineering over conventional collagen gels. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Nov;95(2):447–53.
126. Deng C, Li F, Hackett JM, Chaudhry SH, Toll FN, Toye B, et al. Collagen and glycopolymer based hydrogel for potential corneal application. *Acta Biomater*. 2010 Jan;6(1):187–94.
127. Levis HJ, Brown RA, Daniels JT. Plastic compressed collagen as a biomimetic substrate for human limbal epithelial cell culture. *Biomaterials* [Internet]. 2010;31(30):7726–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.012>
128. Witt J, Borrelli M, Mertsch S, Geerling G, Spaniol K, Schrader S. Evaluation of Plastic-Compressed Collagen for Conjunctival Repair in a Rabbit Model. *Tissue Eng - Part A*. 2019;25(15–16):1084–95.

129. Drechsler CC, Kunze A, Kureshi A, Grobe G, Reichl S, Geerling G, et al. Development of a conjunctival tissue substitute on the basis of plastic compressed collagen. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017 Mar;11(3):896–904.
130. Schrader S, Witt J, Geerling G. Plastic compressed collagen transplantation - a new option for corneal surface reconstruction? Vol. 96, *Acta ophthalmologica.* England; 2018. p. e757–8.
131. Payrau P, Offret G, Faure JP, Pouliquen Y, Hameau JP. [EXPERIMENTAL TRIAL OF THE USE OF COLLAGEN IN OPHTHALMOLOGY]. *Arch Ophtalmol Rev Gen Ophtalmol.* 1963 Mar;23:129–42.
132. Salehi S, Grünert AK, Bahners T, Gutmann JS, Steuhl KP, Czugala M, et al. [New nanofibrous scaffold for corneal tissue engineering]. *Klin Monbl Augenheilkd.* 2014 Jun;231(6):626–30.
133. Greiner A. Elektrosponnen: eine faszinierende Methode zur Präparation ultradünner Fasern *Angewandte.* 2007;5770–805.
134. Lawrence BD, Marchant JK, Pindrus MA, Omenetto FG, Kaplan DL. Silk film biomaterials for cornea tissue engineering. *Biomaterials.* 2009 Mar;30(7):1299–308.
135. Bray LJ, George KA, Ainscough SL, Hutmacher DW, Chirila T V, Harkin DG. Human corneal epithelial equivalents constructed on Bombyx mori silk fibroin membranes. *Biomaterials.* 2011 Aug;32(22):5086–91.
136. Liu J, Lawrence BD, Liu A, Schwab IR, Oliveira LA, Rosenblatt MI. Silk fibroin as a biomaterial substrate for corneal epithelial cell sheet generation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 Jun;53(7):4130–8.
137. Levis H, Daniels JT. New technologies in limbal epithelial stem cell transplantation. *Curr Opin Biotechnol.* 2009 Oct;20(5):593–7.
138. Hos D, van Essen TH, Bock F, Chou CH, Pan HA, Lin CC, et al. Dezellularisierte Kollagenmatrix aus der Schuppe des Tilapia-Fisches als Hornhautersatz („BioCornea“). *Ophthalmologe.* 2014;111(11):1027–32.
139. Loan F, Cassidy S, Marsh C, Simcock J. Keratin-based products for effective wound care management in superficial and partial thickness burns injuries. *Burns* [Internet]. 2016;42(3):541–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2015.10.024>
140. Than MP, Smith R a, Hammond C, Kelly R, Marsh C, Maderal AD, et al. Keratin-

- based Wound Care Products for Treatment of Resistant Vascular Wounds. 2012;5(12):31-5.
141. Than MP, Smith RA, Cassidy S, Kelly R, Marsh C, Maderal A, et al. Use of a keratin-based hydrogel in the management of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Dermatolog Treat*. 2013;24(4):290-1.
 142. Pechter PM, Gil J, Valdes J, Tomic-Canic M, Pastar I, Stojadinovic O, et al. Keratin dressings speed epithelialization of deep partial-thickness wounds. *Wound Repair Regen*. 2012;20(2):236-42.
 143. Lusiana, Reichl S, Müller-Goymann CC. Keratin film made of human hair as a nail plate model for studying drug permeation. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2011;78(3):432-40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.01.022>
 144. Apel PJ, Garrett JP, Sierpinski P, Ma J, Atala A, Smith TL, et al. Peripheral Nerve Regeneration Using a Keratin-Based Scaffold: Long-Term Functional and Histological Outcomes in a Mouse Model. *J Hand Surg Am*. 2008;33(9):1541-7.
 145. Sierpinski P, Garrett J, Ma J, Apel P, Klorig D, Smith T, et al. The use of keratin biomaterials derived from human hair for the promotion of rapid regeneration of peripheral nerves. *Biomaterials*. 2008;29(1):118-28.
 146. Pace LA, Plate JF, Smith TL, Van Dyke ME. The effect of human hair keratin hydrogel on early cellular response to sciatic nerve injury in a rat model. *Biomaterials* [Internet]. 2013;34(24):5907-14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.04.024>
 147. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008 Jul;29(20):2941-53.
 148. Fearing B V., Van Dyke ME. In vitro response of macrophage polarization to a keratin biomaterial. *Acta Biomater* [Internet]. 2014;10(7):3136-44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2014.04.003>
 149. Badylak SF, Valentin JE, Ravindra AK, McCabe GP, Stewart-Akers AM. Macrophage phenotype as a determinant of biologic scaffold remodeling. *Tissue Eng - Part A*. 2008;14(11):1835-42.
 150. Fujii T, Murai S, Ohkawa K, Hirai T. Effects of human hair and nail proteins and their films on rat mast cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19(6):2335-42.

151. Yamauchi K, Yamauchi A, Kusunoki T, Kohda A, Konishi Y. Preparation of stable aqueous solution of keratins, and physicochemical and biodegradational properties of films. *J Biomed Mater Res.* 1996;31(4):439–44.
152. Yamauchi K, Hojo H, Yamamoto Y, Tanabe T. Enhanced cell adhesion on RGDS-carrying keratin film. *Mater Sci Eng C.* 2003;23(4):467–72.
153. Letko E, Stechschulte SU, Kenyon KR, Sadeq N, Romero TR, Samson CM, et al. Amniotic membrane inlay and overlay grafting for corneal epithelial defects and stromal ulcers. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960).* 2001 May;119(5):659–63.
154. Rouse, Jillian G. and Van Dyke ME. A Review of Keratin-Based Biomaterials for Biomedical Applications. 2010;999–1014.
155. Tachibana A, Furuta Y, Takeshima H, Tanabe T, Yamauchi K. Fabrication of wool keratin sponge scaffolds for long-term cell cultivation. *J Biotechnol.* 2002 Feb;93(2):165–70.
156. Messmer EM. Wound healing following amniotic membrane, limbal stem cell and corneal transplantation. *Ophthalmologe.* 2020;117(12):1163–70.
157. Katoh K, Shibayama M, Tanabe T, Yamauchi K. Preparation and physicochemical properties of compression-molded keratin films. Vol. 25, *Biomaterials.* Netherlands; 2004. p. 2265–72.
158. Yamauchi K, Maniwa M, Mori T. Cultivation of fibroblast cells on keratin-coated substrata. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1998;9(3):259–70.
159. Fortunati E, Aluigi A, Armentano I, Morena F, Emiliani C, Martino S, et al. Keratins extracted from Merino wool and Brown Alpaca fibres: Thermal, mechanical and biological properties of PLLA based biocomposites. *Mater Sci Eng C [Internet].* 2015;47:394–406. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.11.007>
160. Fujii T, Ide Y. Preparation of translucent and flexible human hair protein films and their properties. *Biol Pharm Bull.* 2004;27(9):1433–6.
161. Tanase CE, Spiridon I. PLA/chitosan/keratin composites for biomedical applications. *Mater Sci Eng C [Internet].* 2014;40:242–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.03.054>
162. Cui L, Gong J, Fan X, Wang P, Wang Q, Qiu Y. Transglutaminase-modified wool keratin film and its potential application in tissue engineering. *Eng Life Sci.*

- 2013;13(2):149–55.
163. Singaravelu S, Ramanathan G, Raja MD, Barge S, Sivagnanam UT. Preparation and characterization of keratin-based biosheet from bovine horn waste as wound dressing material. *Mater Lett* [Internet]. 2015;152:90–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2015.03.088>
 164. Vasconcelos A, Freddi G, Cavaco-Paulo A. Biodegradable materials based on silk fibroin and keratin. *Biomacromolecules*. 2008;9(4):1299–305.
 165. Feng Y, Borrelli M, Meyer-Ter-Vehn T, Reichl S, Schrader S, Geerling G. Epithelial wound healing on keratin film, amniotic membrane and polystyrene in Vitro. *Curr Eye Res*. 2014;39(6):561–70.
 166. Luttikhuisen DT, Harmsen MC, Van Luyn MJA. Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction. *Tissue Eng*. 2006 Jul;12(7):1955–70.
 167. Espana EM, Acosta AC, Stoiber J, Fernandez V, Lamar PD, Villain FL, et al. Long-term follow-up of a supradescemetic keratoprosthesis in rabbits: An immunofluorescence study. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2011;249(2):253–60.
 168. Wilhelmus KR. The Draize eye test. *Surv Ophthalmol*. 2001;45(6):493–515.
 169. Siebelmann S, Bachmann B, Lappas A, Dietlein T, Hermann M, Roters S, et al. [Intraoperative optical coherence tomography in corneal and glaucoma surgical procedures]. *Ophthalmologe*. 2016 Aug;113(8):646–50.
 170. Geerling G, Müller M, Winter C, Hoerauf H, Oelckers S, Laqua H, et al. Intraoperative 2-dimensional optical coherence tomography as a new tool for anterior segment surgery. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)*. 2005 Feb;123(2):253–7.
 171. Uyar E, Sarıbaş F. Evaluating Depth and Width of Corneal Wounds Using Anterior Segment Optical Coherence Tomography After Foreign Body Removal. *Semin Ophthalmol*. 2022 Aug;37(6):774–9.
 172. Garcia Marin YF, Alonso-Caneiro D, Vincent SJ, Collins MJ. Anterior segment optical coherence tomography (AS-OCT) image analysis methods and applications: A systematic review. *Comput Biol Med*. 2022 Jul;146:105471.
 173. Jiao H, Hill LJ, Downie LE, Chinnery HR. Anterior segment optical coherence tomography: its application in clinical practice and experimental models of disease. *Clin Exp Optom*. 2019 May;102(3):208–17.

174. Schwab R, Reichl S. Dexamethasone-loaded keratin films for ocular surface reconstruction. *J Mater Sci Mater Med.* 2022 Mar;33(3):29.