

Aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. G. Richard

**Etablierung eines Verfahrens zur histologischen Analyse
humaner Hornhäute unter besonderer Beachtung der
Descemet-Membran und des kornealen Endothels**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Andreas Wolfram Benecke

aus Halle/Saale, Deutschland

Hamburg 2009

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am:**

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. G. Richard

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. O. Zeitz

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. G. Sauter

Die Augen sind die Fenster zur Seele
(Franz Kafka)

Die Arbeit widme ich meinen Großeltern der Familien Benecke und Stöhr.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Arbeitshypothese und Fragestellung	01
2 Einleitung	03
2.1 Das menschliche Auge	03
2.2 Aufbau der Hornhaut des menschlichen Auges	05
2.3 Aufbau und Funktion der Descemet-Membran	07
2.4 Das korneale Endothel (Hornhautendothel) und seine Funktion	08
2.5 Pathologische Hornhautveränderungen	10
2.6 Die Hornhauttransplantation	11
2.7 Standardverfahren für die Einbettung humaner Hornhäute und die Anfertigung von Gewebeschnitten	13
2.8 Alternative Einbettungsmethoden	14
2.9 Aufgaben und Funktion histologischer Analyseverfahren	16
2.10 Ziel der Arbeit	17
3 Material und Methoden	18
3.1 Kultivierung von kornealen Endothelzellen	18
3.2 Fixierung des Gewebes und kultivierter Zellen	19
3.2.1 PA-Fixierung der immortalisierten humanen kornealen Endothelzellen	19
3.2.2 Fixierung von humanen Spenderhornhäuten	20
3.2.3 Fixierung der immortalisierten humanen kornealen Endothelzellen	21
3.3 Immunhistochemische Färbungen	21
3.3.1 Immunhistochemische Färbungen mit kornealen Endothelzellen	23
3.3.2 Immunhistochemische Färbungen mit humanen Spenderhornhäuten	24

Inhaltsverzeichnis

3.3.3	Immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten humaner Spenderhornhäute	26
3.3.4	Hämatoxylin-Eosin Färbung	26
3.4	Einbettung von Geweben und Zellen in Acrylharze	27
3.4.1	Einbettung von humanen Spenderhornhäuten	27
3.4.2	Einbettung von kornealen Endothelzellen	28
3.5	Anfertigung von Gewebeschnitten nach Kunststoffeinbettung	28
3.6	Herstellung von Paraffinschnitten	29
3.7	Antikörper (CD-29r, CD-29m, CD-49c, Ki-67)	30
3.8	Fotodokumentation	32
4	Ergebnisse	33
4.1	Paraffingewebeschnitte humaner Spenderhornhäute	33
4.2	Kunststoffeinbettung mittels Acrylkunststoffen	35
4.2.1	Acrylkunststoffe und Polymerisationsverfahren	35
4.2.2	Hornhauteinbettung in L.R.-White 2 (L.R.-White Acrylic Resins) mit wärmeinduzierter Polymerisation	40
4.2.3	Hornhauteinbettung in L.R.-White 1 (L.R.-White Acrylic Resin (hard) mit wärmeinduzierter Polymerisation	41
4.2.4	Hornhauteinbettung in L.R.-White 1 mit katalytisch induzierter Polymerisation	42
4.2.5	Hornhauteinbettung in L.R.-White 2 mit katalytisch induzierter Polymerisation	43
4.2.6	Zellkulturen im Zusammenhang mit der Kunststoffeinbettung (Eigenfluoreszenz)	44

Inhaltsverzeichnis

4.3	Fixierung von Zellkulturen	46
4.4	Färbungen mit monochromen Lösungen (Diaminobenzidin und Permanent Red)	47
4.4.1	Diaminobenzidin vor und nach Kunststoffeinbettung	47
4.4.2	Permanent Red vor und nach Kunststoffeinbettung	48
4.5	Färbungen mit Fluoreszenzfarbstoffen	49
4.5.1	FITC vor und nach der Kunststoffeinbettung	49
4.5.2	Alexa 555 vor und nach der Kunststoffeinbettung	52
4.5.3	Doppelfärbung mit Alexa488 und Alexa 555 vor und nach Kunststoffeinbettung	50
4.6	Einbettung von Spenderhornhäuten nach immunhistochemischer Färbung	53
4.6.1	Monochrom gefärbte humane Spenderhornhäute vor und nach Kunststoffeinbettung	54
4.6.2	Fluoreszenz-markierte humane Spenderhornhäute vor und nach der Kunststoffeinbettung	55
5	Diskussion	59
5.1.	Diskussion der Problematik der Paraffineinbettung	59
5.2.	Diskussion der Methodik	60
5.2.1.	Fixierung der humanen Spenderhornhäute und humanen, kornealen Endothelzellen	60
5.2.2.	Dehydrierung,	62

Inhaltsverzeichnis

5.2.3.	Infiltration	63
5.2.4.	Antigen-Retrieval	64
5.3.	Vergleich der verschiedenen Kunststofftypen	64
5.4.	Polymerisation	65
5.4.1.	Polymerisationsarten	65
5.4.2.	Polymerisationstemperatur	67
5.5.	Diskussion der Ergebnisse	68
5.5.1.	Fluorochrom-markierte Antikörper.	68
5.5.2.	Chromogene Färbelösungen: 3`3 Diaminobenzidin (DAB)	69
5.5.3.	Chromogene Färbelösungen: Permanent-Red (P-Red)	69
5.6.	Paraffin vs. Kunststoffeingebetteten Spenderhornhäute	70
6	Zusammenfassung	72
7	Literaturverzeichnis	74
8	Danksagung	82
9	Lebenslauf	83
10	Erklärung	84

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

AK = Antikörper

AP = Alkaline Phosphatase

CD = Cluster of Differentiation/Unterscheidungsgruppen

cps = Centipoise, Maßeinheit der dynamischen Viskosität

DAB = 3'3 Diaminobenzidin

dpt = Dioptrie (Einheitenzeichen: dpt) ist der Kehrwert der Maßeinheit Meter

FCS =fetales Kälberserum (fetal calf serum)

g = Erdbeschleunigung

HRP = Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase)

IHC = Immunhistochemie

LSAB = Streptavidin konjugiertes Biotin (Labelled-Streptavidin Biotin)

PBS = Phosphat-gepufferte Lösung (phosphat buffered solution)

PA = Paraformaldehyd

PKP = perforierende Keratoplastik/Hornhauttransplantation

PLT = Progressive Lowering of Temperature technique

P-Red = Permanent Red

SV 40 = Simianes Virus 40

TBS = Tris-Buffered Solution

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Transparenz der Augenhornhaut des Menschen beruht unter anderem auf einer speziellen Anordnung der Matrixmoleküle im Hornhautstroma, die ihrerseits nur bei einem definierten Wassergehalt aufrechterhalten werden kann. Die Regulation des Wassergehaltes erfolgt über das einschichtige korneale Endothel. Die kornealen Endothelzellen besitzen eine ausgeprägte Basallamina, die so genannte Descemet-Membran. In der Hornhautbank der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurde ein Verfahren zur Transplantation kultivierter humaner kornealer Endothelzellen auf Spenderhornhäute entwickelt. Die bisherigen Resultate lassen darauf hoffen, dass in Zukunft eine Degeneration des kaum regenerationsfähigen humanen kornealen Endothels durch Zelltransplantationen therapiert werden kann.

Untersuchungen zur Anheftung der Endothelzellen an die Descemet-Membran werden durch den Verlust der Gewebeintegrität im Verlauf der histologischen Aufarbeitung erschwert. Es gilt, durch Anwendung eines optimierten Protokolls für die Einbettung von Augenhornhäuten in Kunstharz, einen besseren Erhalt des Gewebes zu erreichen als durch Einbettung in Paraffin und zu untersuchen, unter welchen Bedingungen es möglich ist, immunhistochemische Analyseverfahren des Gewebes durchzuführen.

Bei dieser Arbeit wurden humane Spenderhornhäute, die nicht zur Transplantation geeignet waren sowie durch SV40 Transfektion immortalisierte humane korneale Endothelzellen (*Bednarz et al. 2000*) verwendet.

Es wurden Hörnhäute in verschiedene Kunststoffharze eingebettet und anhand der Gewebeschnitte, die Gewebeintegrität in Abhängigkeit wesentlicher Parameter, wie Art der Gewebefixierung und Einbettungstemperatur mikroskopisch untersucht.

Die Anwendung von immortalisierten humanen kornealen Endothelzellen ermöglichte eine detaillierte, histologische Untersuchung in Hinblick auf: Anwendbarkeit von Antikörpern und deren Verdünnung, die Anwendbarkeit

Arbeitshypothese und Fragestellung

verschiedenen Farbstoffe (chromogenen und fluoreszierenden Farbstoffen) im Zusammenhang mit der Polymerisationsform und des verwendeten Acrylkunststoffes.

Auf der Grundlage der dabei erzielten Resultate wurde ein optimiertes Protokoll zur Einbettung humaner Spenderhornhäute erstellt. Im Anschluss erfolgten immunhistochemische Färbungen im Zusammenhang mit dem etablierten Protokoll und eine Überprüfung der Anwendbarkeit der immunhistochemischen Analyseverfahren.

2. Einleitung

2.1. Das menschliche Auge

Mit 90 Prozent aller Sinneswahrnehmungen ist das Auge, lateinisch *oculus*, eines der wichtigsten Sinnesorgane des Menschen. Der angemessene Reiz für dieses Sinnesorgan ist beim Menschen elektromagnetische Strahlung mit einer Wellenlänge von etwa 400 nm bis 750 nm (*Huppelsberg und Walter 2003*). Im Auge erzeugt der empfangene Reiz eine Änderung der Erregung in den ableitenden Nervenbahnen. Das Auge steht am Anfang der Sehbahn, die im Gehirn diese Erregungsänderung zum visuellen Kortex weiterleitet. Im visuellen Kortex und in anderen übergeordneten Zentren werden die vom Auge stammenden Erregungsmuster schließlich zur Empfindung von Licht und Farbe verarbeitet.

Die Augen liegen in den schützenden, kugelförmigen Orbitae, in so genannten Knochenhöhlen (*Junqueira und Carneiro 1991*). Abbildung 2.1 zeigt ein menschliches Auge, als Beispiel eines Vertebratenauges. Das Sehorgan der Säugetiere und damit auch des Menschen ist in verschiedene Einheiten gegliedert. Zum Einem gibt es den Augapfel, *bulbus oculi* (lat.) oder *Ophthalmos* (griech), zum Anderen gibt es Anhangsorgane wie z.B. Tränenapparat, Augenmuskeln, Bindehaut und Augenlider. Der Augapfel besteht aus drei wesentlichen Schichten. Die äußere, weiße Augenhaut wird auch als Lederhaut bezeichnet. Sie geht im vorderen Augenabschnitt in die durchsichtige Hornhaut über, auf die im Folgenden ausführlicher eingegangen wird. Die mittlere Schicht wird gebildet aus Aderhaut, Ziliarkörper und Regenbogenhaut. Das Innere der Augenhaut wird aus der Netzhaut mit Pigmentepithel gebildet. Im Tierreich sind aber auch völlig andere Augen beschrieben, wie z.B. Facettenaugen.

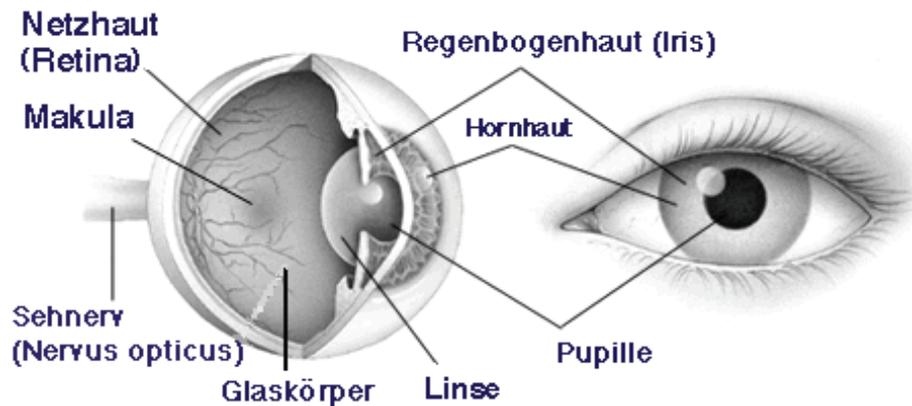


Abbildung 2.1: Die Abbildung zeigt ein menschliches Auge. Die Hornhaut (Cornea) ist ein transparentes Gewebe mit glatter und glänzender Oberfläche. Sie bildet den gewölbten, vorderen Teil der äußeren Augenhaut des Augapfels. Durch die Hornhaut dringt das Licht ins Auge. Die Pupille wirkt als automatische Blende und ist ein elementarer Bestandteil des optischen Systems. Die Iris, auch Regenbogenhaut genannt, trennt die vordere Augenkammer von der hinteren Augenkammer. Die Linse ist ein transparentes abgeflacht-kugeliges Gebilde deren Brennweite durch den Ziliarmuskel geregelt wird. Der Glaskörper ist eine durchsichtige Substanz in der hinteren Augenkammer, die durch ihren Druck die Form des Auges gewährleistet. Die Netzhaut ist eine Schicht aus Nervenzellen, die Farb- und Helligkeitsunterschiede registrieren. Der gelbe Fleck, Makula genannt, ist der lichtempfindlichste Bereich der Netzhaut und gleichzeitig der Punkt mit der schärfsten Wahrnehmung. Der Sehnerv (nervus opticus) leitet alle Signale von der Netzhaut in einem Nervenstrang zum Gehirn. (Abbildung aus: <http://www.uniklinikum-giessen.de/augen/anatomie.html>; Stand: 1.3.2007)

Die Hornhaut ist ein klares Scheibchen und zirkulär durch den Limbus von der Sklera abgegrenzt. Die normale menschliche Hornhaut ist horizontal elliptisch mit einem Durchmesser von 10,6 mm bis 11,7 mm (Lang 1998) und sphärisch gewölbt. Der Radius dieser Wölbung beträgt etwa 7,7 mm. Im Zentrum ist die Hornhaut dünner (0,55 mm) als am Rand (0,65 mm). Die Hornhaut gilt als wichtiger Bestandteil des dioptrischen Apparates.

Der dioptrische Apparat besteht aus der Hornhaut, der Linse, der Iris, dem Kammerwasser und dem Glaskörper. Die Hornhaut ist mit Ihrer Brechkraft maßgeblich für das Sehen verantwortlich. Die Gesamtbrechkraft des dioptrischen

Einleitung

Apparates beträgt 58 Dioptrien (dpt), wobei die Hornhaut 40-45 dpt besitzt. Die hohe Brechkraft wird durch die unterschiedlichen Brechungsindizes der Hornhaut gegenüber den sie umgebenden Medien Luft (1,0 dpt) und Kammerwasser (1,33 dpt) hervorgerufen (Grehn und Leydecker 1995). Die Linse ist elastisch und ermöglicht die Akkomodation. Die Iris reguliert die Pupillenweite und ist Teil der Adaptionsmechanismen. Das Kammerwasser ernährt die nicht vaskularisierten Teile des dioptrischen Apparates und bestimmt den Augeninnendruck. Der Glaskörper gewährleistet durch Druck die Form des Auges.

Der dioptrische Apparat sorgt dafür, dass parallel in das Auge einfallende Lichtstrahlen auf einen Punkt der Netzhaut gebündelt werden und so eine scharfe Abbildung erzeugt wird. Jede Unregelmäßigkeit oder Trübung beeinträchtigt die Sehfähigkeit gravierend.

2.2. Aufbau der Hornhaut des menschlichen Auges

Die Abbildung 2.2 zeigt eine schematische Darstellung der einzelnen Hornhautschichten und soll eine Grundlage zur Orientierung für die in dieser Arbeit gewonnenen Gewebeschnitte darstellen.

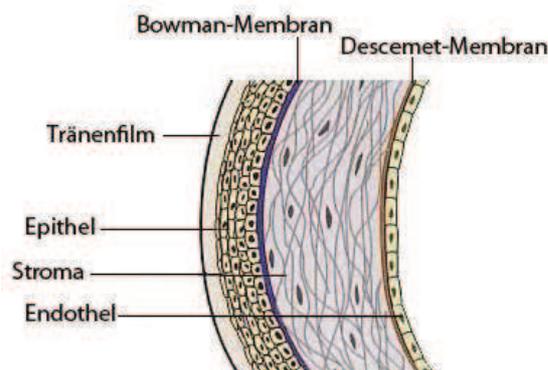


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines Hornhautquerschnittes. Die Hornhaut ist aus verschiedenen Schichten aufgebaut, die alle eine eigene Funktionalität besitzen. Die Hornhaut besteht aus 5 verschiedenen Schichten: der Epithelschicht, der Bowmanschen-Membran, dem Stroma, der Descemet-Membran und der Endothelschicht. Der in dieser Abbildung gezeigte Querschnitt soll eine Grundlage zur Orientierung für die in dieser Arbeit gewonnenen Gewebeschnitte darstellen. (Abb.: http://www.interlens.org/_img/cont_querschnitthornhaut.jpg; Stand 01.03.2007)

Einleitung

Die menschliche Hornhaut besteht aus fünf Schichten: Von außen nach innen betrachtet besteht die Hornhaut aus einer Epithelschicht, gefolgt von der Bowmanschen-Membran, die das Epithel widerstandsfähig gegen mechanische Beanspruchung, z.B. Augenreiben, macht. Nach der Bowmanschen-Membran folgt das Stroma, welches ca. 90 % der Hornhautdicke ausmacht. Die Descemet-Membran schließt sich dem Stroma an. Nach der Descemet-Membran folgt eine einschichtige Endothelzellschicht.

Die Epithelzellschicht, die die konvexe Oberfläche der Hornhaut bildet, besteht aus einem mehrschichtigen, nicht verhornenden Plattenepithel. Das Epithel ist im Durchschnitt 40-60 µm dick, wobei seine Dicke zum Limbus hin zunimmt. Lediglich die basale Zellschicht besitzt die Fähigkeit zur Regeneration (*Matsuda et al. 1986*). Die Regeneration dieser Zellschicht erfolgt etwa alle 7 Tage (*Junqueira und Carneiro 1991*). Das Epithel besteht zu 30 % aus Keratinen. Die Epithelzellschicht ist für viele Stoffe impermeabel und trägt somit zur Abwehr von Krankheitserregern bei. Die Keimabwehr setzt eine Unversehrtheit des Epithelverbandes voraus (*Lang 1998*).

Der Epithelzellschicht liegt der Bowmanschen-Membran auf, welche die Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischen Beanspruchungen erhöht. Die Bowmanschen-Membran wird auch als Lamina limitans anterior bezeichnet und ist ca. 10 µm dick. Die Bowmanschen-Membran besteht aus feinen kollagenen Fibrillen, die keine bevorzugte Ausrichtung aufweisen, sowie einer dichten Interzellulärsubstanz (*Bucher und Wartenberg 1997; Junqueira und Carneiro 1991*). Zellen sind in der Bowmanschen-Membran nicht vorhanden (*Grehn 1998*). Die Membran ist nicht regenerationsfähig und heilt nach Verletzung unter Narbenbildung aus (*Lang 1998*).

Nach der Bowmanschen-Membran folgt das Stroma, welches mit ca. 90 % den größten Teil der Hornhaut ausmacht (*Bucher und Wartenberg 1997*). Das Stroma bildet die mittlere Schicht der Hornhaut und ist mit einem Durchmesser von ca. 400 µm die dickste aller Hornhautschichten. Im Stroma befinden sich Stromazellen, deren Fortsätze wie Schmetterlingsflügel abgeplattet sind. Das Hornhautstroma, auch Substantia propria genannt, besteht hauptsächlich aus Kollagenfibrillen in einer Grundsubstanz aus Glykosaminoglykanen, sauren

Mukopolysacchariden und den Proteoglykanen Keratansulfat und Chondroitinsulfat (*Junqueira und Carneiro 1991; Kriegelstein et al. 1999*), welche für die hohe Wasserbindungsfähigkeit und damit Lichtdurchlässigkeit der Hornhaut verantwortlich sind. Im Hornhautstroma sind vereinzelt Makrophagen und wandernde lymphatische Zellen nachweisbar (*Junqueira und Carneiro 1991*). Das Stroma wird vorderkammerwärts durch die Descemet-Membran begrenzt.

2.3. Aufbau und Funktion der Descemet-Membran

Die Descemet-Membran, eine glasige Schicht zwischen dem Stroma und dem Endothel, wird auch als Demours-Membran, Lamina limitans posterior oder hintere Basalmembran bezeichnet. Sie gilt als die dickste Basalmembran im menschlichen Körper. Sie ist zur Zeit der Geburt etwa 4 μm (*Stur und Grabner 1983*) und im Erwachsenenalter ca. 8-10 μm dick (*Stur und Grabner 1983; Junqueira und Carneiro 1991*). *Wolf (1951)* beschreibt die Descemet-Membran als eine feste, strukturlose, Chemikalien und pathologischen Prozessen gegenüber resistente Membran, welche sich in einem Zustand der Spannung befindet.

Es wird vermutet, dass die Descemet-Membran ein Ausscheidungsprodukt des Endothels ist und/oder dass die Endothelzellen wiederum Enzyme aktivieren, die für die Bildung der Descemet-Membran verantwortlich sind (*Jakus 1956*).

Die Descemet-Membran ist durchsichtig, homogen und besteht hauptsächlich aus Kollagenfasern des Typs IV (*Newsome et al. 1982; Nakayasu et al. 1986*), und Kollagen Typ VIII (*Kapoor et al. 1988; Levy et al. 1996*) und Laminin; wie z.B. Laminin 5 (*Ebihara et al. 2000*). Die Kollagenfibrillen bilden ein regelmäßiges, zweidimensionales Sechseckraster. Die Descemet-Membran gilt als widerstandsfähigste und elastischste Membran der gesamten Hornhaut.

Neben der Schutzfunktion für das Endothel wirkt die Descemet-Membran wirkungsvoll Infektionen, mechanischen und chemischen Verletzungen sowie enzymatischer Zerstörung entgegen. Nach Verletzungen kommt es zur Wundheilung nur unter Narbenbildung.

2.4. Das korneale Endothel (Hornhautendothel) und seine Funktion

Das korneale Endothel besteht aus einer Einzelschicht hexagonaler Zellen. Diese sind etwa 5 µm dick und haben einen Durchmesser von ca. 20 µm. Die Zellen sind in ihrer Form regelmäßig und ähnlich groß. Die Zelldichte beträgt bei Geburt 3500-4000 Zellen/mm² (*Krieglstein et al. 1999*) und nimmt mit fortschreitendem Alter stetig ab. Beim erwachsenen Menschen beträgt sie ungefähr 1400-2500 Zellen/mm². Diese Abnahme kann durch Verletzungen oder Erkrankungen noch verstärkt werden (*Waring et al. 1982, Lopez et al. 1989*).

Im Gegensatz zum Epithel besitzt das Endothel kaum Fähigkeiten zur Regeneration. *Laing et al. (1984)* konnten nur vereinzelt Mitosen nachweisen.

Das Endothel reagiert auf Schädigungen vornehmlich mit Abflachung benachbarter, intakter Zellen (*Stur und Grabner 1983*) und mit Bildung von Riesenzellen (*Reim 1985*), das heißt, es bleibt ein zusammenhängender Zellverband erhalten, jedoch mit abnehmender Zelldichte. Dabei verlieren die Zellen ihre regelmäßige Form, und es entstehen Zellen unterschiedlicher Form und Größe. Durch diesen Vorgang ist gewährleistet, dass die Descemet-Membran immer vollständig von Endothelzellen bedeckt bleibt.

Ein starker Verlust von Endothelzellen führt zu einer Dekompensation der Hornhaut. Nicht nur durch den Alterungsprozess, sondern auch durch Verletzungen, Krankheiten, und während der Entwicklung der Hornhaut können Schädigungen des Endothels auftreten.

Endothelzellen besitzen große Kerne und reichlich zytoplasmatische Organellen, wie Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum, freie Ribosomen und Golgi-Apparate. Damit sind die Endothelzellen aktiv am Stoffwechsel beteiligt. Die Endothelzellen sind eng miteinander durch komplexe Anschlussstellen verbunden. Es sind aber keine Desmosomen vorhanden. Durch Spaltverbindungen können Moleküle und Elektrolyte zwischen den Endothelzellen hindurch gelangen. Die gegenseitige Verbindung der Endothelzellen ist eine für das Kammerwasser durchlässige Barriere. Im Vergleich zum Epithel ist das Endothel für Wasser siebenmal mehr und für Ionen 400-mal durchlässiger als das

Einleitung

Epithel. Eine der wichtigsten Aufgaben des Endothels ist es, die Aufrechterhaltung des Hydratationszustandes des Stromas zu sichern und die Transparenz der Hornhaut zu erhalten (*Fromm et al. 1991*). Die Transparenz der Hornhaut beruht auf einer regelmäßigen und gitterartigen Anordnung der Kollagenfibrillen (*Maurice 1957*), somit entsteht ein so genanntes optisches Gitter. 1873 hat Theodor Leber die Barrierefunktion des Hornhautendothels, die das Eindringen von Kammerwasser in das Hornhautstroma verhindert, beschrieben und nachgewiesen. Das Gleichgewicht zwischen Hydratation, dem passiven Einströmen von Wasser in die Hornhaut, und Dehydratation, aktiver Transport von Wasser nach außen, wird durch den aktiven Elektrolyttransport der im Hornhautendothel lokalisierten $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ aufrechterhalten (*Junqueira und Carneiro 1991, Grehn 1998*). *Maurice* beschrieb im Jahre 1968 eine energieabhängige Pumpe, die aktiv HCO_3^- und Na^+ Ionen und passiv Gewebsflüssigkeit aus dem Hornhautstroma in die Vorderkammer transportiert, wodurch die Hornhaut entquillt und ihre Klarheit erhalten bleibt. *Mishima und Hayakawa (1972)* hingegen beschrieben einen aktiven Transportmechanismus in der Gegenrichtung, der vor allem Glucose in das Hornhautstroma transportiert. Das durch den Stoffwechselfvorgang eindringende Wasser muss von den Endothelzellen unter Verbrauch von Stoffwechselenergie wieder aus der Hornhaut herausgepumpt werden.

Ist die Barrierefunktion, bzw. Pumpfunktion des Hornhautendothels vermindert, bzw. gestört, so dringt vermehrt Kammerwasser in das Hornhautstroma ein. Der erhöhte Einstrom von Kammerwasser führt zu einer Dickenzunahme der Hornhaut (*Stur und Grabner 1983*). Für die Aufrechterhaltung der Pumpleistung des Endothels ist eine Zelldichte von mindestens 300-500 Zellen/ mm^2 nötig, andernfalls kommt es zur Dekompensation des Stromas und zur Eintrübung der Hornhaut (*Bourne und Kaufmann 1976*). Bei einer höheren Zelldichte können die verbleibenden Endothelzellen die Pump- und Barrierefunktion der ausgefallenen Zellen kompensieren (*Geroski et al. 1985*).

Eine weitere Aufgabe des kornealen Endothels besteht in der Synthese bestimmter Komponenten der Descemet-Membran, wie z. B. der Synthese von Sekreteiweiß für die Erhaltung der Descemet-Membran (*Junqueira und Carneiro*

1991), und der Regulierung des Austausches von Stoffwechselprodukten zwischen Kammerwasser und Stroma (*Davson 1972, Maurice und Riley 1970, Waring et al. 1982*).

2.5. Pathologische Hornhautveränderungen

Jede Unregelmäßigkeit der Hornhaut oder Hornhauttrübung beeinträchtigt die Sehfähigkeit gravierend. Neben der AMD, altersabhängige Makuladegeneration, und der diabetischen Retinopathie (bei jungen Menschen) gelten Hornhauttrübungen gelten als häufigste Ursache für Erblindungen (*Taylor 1986*). Bei den angeborenen Veränderungen der Hornhaut, den kongenitalen Anomalien, wird unterschieden zwischen peripheren Anomalien, wie zum Beispiel der Rieger Anomalität und zentralen Anomalien wie der Peter Anomalie und dem Keratokonus posterior. Bei der Peter Anomalie handelt es sich um eine zentrale Hornhauttrübung mit entsprechenden Defekten im hinteren Stroma, der Descemet-Membran und dem Endothel. Beim Keratokonus posterior handelt es sich um eine zentrale Einsenkung der Hornhaurückfläche mit darüberliegender Stromatrübung. Bei dieser Erkrankung fehlen die Descemet-Membran und das Endothel stellenweise. Der Defekt kann sowohl lokal als auch flächendeckend auftreten.

Chronische Entzündungen oder altersbedingte Erkrankungen wie zum Beispiel die Endothelzellatrophie bei der Fuchs'schen Erkrankung, oder auch die bullöse Keratopathie führen ebenfalls zur Veränderung der Hornhaut, bzw. stellen pathologische Veränderungen dar. Bei der bullösen Keratopathie handelt es sich um eine Hornhauteintrübung mit blasiger Abhebung des Epithels. Ursache ist das erkrankte Endothel, das das Kammerwasser nicht mehr aus dem Hornhautstroma pumpen kann wodurch die Hornhaut aufquillt. Die bullöse Keratopathie ist eine der häufigsten Indikationen zur Hornhauttransplantation. Bei der Fuchs'schen Erkrankung, der Fuchs-Endotheldystrophie, handelt es sich um ein fortschreitendes epitheliales und stromales Ödem, welches verursacht wird durch eine verminderte Pumpfunktion der erkrankten Endothelzellen. Charakteristisch

für diese Erkrankung ist die reduzierte Endothelzellichte und/oder eine warzenförmige oder diffuse Verdickung der Descemet-Membran.

Weitere Veränderungen der Hornhaut können durch Verätzungen, Verbrennungen, perforierende Traumen oder Hornhautinfektionen, wie zum Beispiel bei bakteriellen Keratitiden, verursacht werden.

2.6. Die Hornhauttransplantation

Die Hornhauttransplantation oder perforierende Keratoplastik gilt derzeit als Therapiemöglichkeit der Wahl bei Hornhauttrübungen. Bei der perforierenden Keratoplastik, kurz PKP, wird der zentrale Anteil der Hornhaut durch eine geeignete Spenderhornhaut ersetzt. Der häufigste Durchmesser des Transplantates beträgt 7,5 mm. Die erkrankte und trübe Hornhaut wird dabei kreisförmig ausgestanzt und durch eine klare Spenderhornhaut ersetzt. Die Spenderhornhaut wird durch einfache oder doppelt fortlaufende Naht, bzw. Einzelknopfnähte fixiert. Die perforierende Keratoplastik ist bei allen Erkrankungen indiziert, bei denen das gesamte Stroma betroffen ist (Trübungen, Infektion oder pathologische Wölbungen). Die Hornhauttransplantation gehört zu den erfolgreichsten Transplantationen.

Neben der perforierenden Keratoplastik sind lamelläre Keratoplastiken bei oberflächlichen Hornhauttrübungen möglich. Bei der lamellären Keratoplastik werden lediglich die oberflächlichen Schichten der erkrankten Hornhaut ersetzt. Die perforierende Keratoplastik war bisher die Standardtechnik zur Therapie endothelialer Hornhauterkrankungen. In den letzten Jahren hat sich jedoch die Technik der posterioren lamellären Keratoplastik (mittels Descemetstripping und Mikrokeratom:) deutlich verbessert (*Melles und Kamminga 2003, Cursiefen und Kruse 2008*). Bei der PKP als auch bei der lamellären Keratoplastik werden Spenderhornhäute verwendet, die zuvor kultiviert wurden. Die Kultivierung der Hornhäute hat entscheidende Vorzüge: Keratoplastiken sind gut planbar, es ist stets ein Kontingent von Spenderhornhäuten vorhanden, das Hornhautendothel kann während der Kultivierung, Aufbereitung, mikroskopisch beurteilt werden, so dass die

Einleitung

Transplantation einer Spenderhornhaut mit etwaigen Schäden oder einer geringen Endothelzelldichte vermieden wird. Die Endothelzelldichte ist das entscheidende Kriterium für die Qualität der Hornhaut und sollte nicht unter 2000 Zellen/mm² liegen.

Die Möglichkeit der Transplantation einer künstlichen Hornhaut ist eine zukünftige Therapieoption, befindet sich aber derzeit im Entwicklungsstadium. In Kooperation mit der Technischen Hochschule Braunschweig und der Universität Bremen wurden bereits erfolgreich künstliche Hornhautäquivalente hergestellt und für pharmakologische Untersuchungen verwendet (*Reichl et al. 2004, 2005, Meyer et al. 2005, Zorn-Kruppa et al. 2005*). Ein internationales Konsortium startete 2004 ein von der Europäischen Union gefördertes Projekt mit dem Ziel, Hornhautäquivalente für die Transplantation aus humanen Komponenten herzustellen. Im Rahmen dieses Projektes wurde ein Hornhautäquivalent entwickelt, das jedoch noch nicht für eine Transplantation geeignet ist (*Vrana et al. 2008*).

Das korneale Endothel ist nur eingeschränkt teilungsfähig und geschädigtes Endothel kann bisher nur durch PKP oder posteriore lamelläre Keratoplastik jeweils unter Verwendung einer Spenderhornhaut ersetzt werden. Eine zukünftige therapeutische Alternative stellt die Transplantation von isolierten und in-vitro-kultivierten Endothelzellen dar (*Engelmann et al. 1999*).

Eine zweite Anwendungsmöglichkeit dieser Methode besteht darin, Spenderhornhäute, die wegen einer zu geringen Endothelzelldichte nicht für eine Transplantation freigegeben werden, durch Endothelzelltransplantation mit einem Endothel ausreichender Zelldichte auszustatten und diese Spenderhornhäute somit doch für Transplantationen einsetzbar zu machen

Der langfristige Erfolg einer Transplantation kornealer Endothelzellen setzt eine dauerhafte Anheftung der Zellen an die Descemet-Membran voraus. Für die Untersuchung der Anheftung der kornealen Endothelzellen nach Transplantation wurden histologische Verfahren angewendet, die auch bei der routinemäßigen

Untersuchung pathologischer Hornhautveränderungen zum Einsatz kommen. Diese Verfahren werden im Folgenden kurz dargestellt.

2.7. Standardverfahren für die Einbettung humaner Hornhäute und die Anfertigung von Gewebeschnitten

Das Standardverfahren für die Einbettung humaner Hornhäute für die Anfertigung von Gewebeschnitten ist die Paraffineinbettung. Von dem in Paraffin eingebettetem Gewebe können 2-5 μm Schnitte angefertigt und auf beschichtete Objektträger aufgebracht werden. Zudem sind in Paraffin eingebettete Objekte konservierbar. Bei der Paraffinierung werden die fixierten Präparate mit einer graduierten Alkoholreihe entwässert. Im Anschluss bringt man die fixierten Präparate in einen Paraffinisierungsautomaten (Citadel) um das Gewebe zu dehydrieren und mit Paraffin zu infiltrieren. Der Paraffinisierungsautomat dehydriert das Gewebe mit einer graduierten Alkoholreihe und Chloroform. Die erste Runde beginnt mit 70 % Alkohol bei einer Dauer von einer Stunde, gefolgt von drei Runden mit 96 % Alkohol bei einer Dauer von je einer Stunde. Im Anschluss an die drei Stunden folgen drei weitere Dehydrierungsvorgänge mit 100 % Alkohol. Nachdem die Alkoholreihe abgeschlossen ist, folgen drei Chloroformzwischenritte (jeweils eine Stunde). Nachdem der Dehydrierungsvorgang abgeschlossen ist, folgen zwei Infiltrationsvorgänge mit 53 °C - 55 °C warmen Paraffin für jeweils zwei und drei Stunden. Im Anschluss wird das Gewebe aus dem Paraffinisierungsautomaten entnommen und zwischen Metallwinkeln platziert, die einen kubischen Rahmen bilden und mit flüssigem Paraffin aus der Paraffinausgussstation (Leica EG 1120) befüllt werden. Das dehydrierte und mit Paraffin infiltrierte Gewebe wird somit vollständig von Paraffin umschlossen. Durch die Metallwinkel, die eine kubische Struktur formen, entsteht ein handlicher Paraffinblock der das Gewebe umschließt und anschließend am Microtom (Leica/Wetzlar), in 3 – 5 μm , geschnitten werden kann. Dieses Standardverfahren ist hinsichtlich der Material- und Gewebekosten günstig. Ein wesentlicher Nachteil des Paraffins besteht darin, dass das Gewebe während der Durchtränkung eine beachtliche Schrumpfung von 8-20 % erfährt. Außerdem

können die Proteinstrukturen bzw. Antigen determinaten des Gewebes durch inter- und intramolekulare Vernetzungen verändert werden, die in der Regel durch Formalinfixierung verursacht werden. Die veränderte Gewebearchitektur, verursacht durch Quervernetzungen inter- und intramolekulare Strukturen, bzw. mechanische Irritationen durch die Schnittherstellung stellen einen wesentlichen Nachteil dieses Verfahrens dar.

Gerade bei dieser Methode stellt die Besonderheit der Hornhaut ein Problem dar. Die menschliche Hornhaut, die einen schichtartigen Aufbau aufweist, ist aus histologischer Sicht ein schwierig zu bearbeitendes Gewebe. Durch das histologische Protokoll kommt es zu Ablösungen der Descemet-Membran und zu Auffaltungen des Stromas. Bei Routineuntersuchungen wird dieser Nachteil toleriert, weil dieses Verfahren hinsichtlich der Material- und Gewebekosten günstig ist und eine zuverlässige Diagnostik erlaubt. Der Einsatz der Paraffineinbettung, in Hinblick auf Untersuchungen im Zusammenhang mit der Transplantation humaner kornealer Endothelzellen, ist aber im Hinblick auf die Gewebemorphologie und Gewebeintegrität wenig Erfolg versprechend. Für eine zweifelsfreie Immunhistochemie ist eine unversehrte Gewebearchitektur Grundvoraussetzung. Hydrophile Kunststoffe stellen eine mögliche alternative Einbettungsmethode dar.

2.8. Alternative Einbettungsmethoden.

Mögliche alternative Einbettungsmethoden sind Kunststoffeinbettungen mittels Epoxid-Acrylate, L.R. White Acrylate und die Kryostathistologie, bei der das Gewebe als kleiner Block mit wenigen mm Kantenlänge in flüssigem Stickstoff (-196 °C) schockgefroren wird. Bei der Kryostathistologie erfolgt keine Fixierung des Gewebeblockes vor dem Schneiden, wie bei der Paraffinhistologie. Die Blöcke werden ebenfalls am Microtom geschnitten. Die Schnitte werden auf Objektträger aufgezogen und getrocknet. Danach erst werden sie in Aceton oder Methanol fixiert. Eine weitere Möglichkeit ist eine Fixierung in wässrigem Formalin oder Paraformaldehyd (jeweils 4 % bis 10 %). Falls die Schnitte nicht sofort weiter

Einleitung

verarbeitet werden, erfolgt die Lagerung der fixierten und trockenen Präparate gut verpackt bei -20 °C.

Hydrophile Kunststoffe haben sich in der Vergangenheit bei der Einbettung von Geweben und der anschließenden Herstellung von Gewebeschnitten für immunhistochemische Färbungen als praktikabel erwiesen (*Newman und Hobot 1987*), weil sie gute Ergebnisse hinsichtlich des Erhaltes der Gewebestrukturen als auch bei dem Antikörpernachweis erbracht haben. Sie stellen somit eine sinnvolle alternative Einbettungsmethode zum Standardverfahren der Paraffineinbettung dar.

Epoxid-Kunststoffe können auf Grund der schlechten Färbemöglichkeiten bei Routineanwendungen für Lichtmikroskopie nicht verwendet werden. L.R.-White stellt eine gute Alternative für diesen Anwendungsbereich dar. L.R.-White wurde entwickelt von der London Resin (LR) Company und gehört zu den niedrig viskösen Acrylkunststoffen. Nach Angaben des Herstellers handelte es sich bei den hier verwendeten Kunststoffen L.R.-White Acrylic Resins (weich) und L.R.-White Acrylic Resin (hart) um hydrophile Acrylkunststoffe, die beim Routineeinsatz von Licht- und Elektronenmikroskopie in der Histochemie und Immunhistochemie Anwendung finden. Der niedrig visköse Kunststoff, 8 cps (fast wie Wasser), infiltriert fast jegliches Gewebe. Zudem bietet L.R.-White, als Einbettungsmedium, den Vorteil, sowohl für Licht- als auch Elektronenmikroskopie anwendbar zu sein. Der Hersteller gibt an, dass in L.R.-White eingebettete Gewebeproben, eine gute Analyse des Gewebes unter Erhalt der Zellstrukturen ermöglicht. Die Hauptanwendungsgebiete liegen in der Histochemie, Zytochemie und Immunhistochemie. Diagnostisch ist L.R.-White anwendbar bei Nieren-, Lymphknoten-, und Knochenmarkserkrankungen.

L.R.-White wird hauptsächlich für histochemische Nachweise von resistenten Enzymen und intrazellulären Immunglobulinen in der Immunhistochemie verwendet. Die Zahl der anwendbaren Antikörper, die eine gute Färbung ermöglichen, ist laut Angaben des Herstellers, nicht ausreichend determiniert.

Die Polymerisation der Kunststoffgewebeschnitte, unter Verwendung von L.R.-White kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Es werden drei Arten der

Polymerisation unterschieden. Zu unterscheiden sind die Wärme induzierte Polymerisation, die katalytische Polymerisation mittels eines L.R.-White Acrylic Resin Accelerator (Sigma Aldrich), in unserem Fall auch Kaltpolymerisation genannt, und die UV-Licht induzierte Polymerisation.

2.9. Aufgaben und Funktion histologischer Analyseverfahren

Als Antikörperfärbung wird in der Biologie und Medizin eine Methode bezeichnet, bei der Antigene, z.B. Proteine und Moleküle innerhalb eines mikroskopischen Gewebes, mit Hilfe von Antikörpern, sichtbar gemacht werden. Die Immunhistochemie ermöglicht es unter anderem, Proteinexpressionen zu studieren oder pathologische Strukturen zu erkennen.

Der immunhistochemische Nachweis beruht auf der Affinität von Antikörpern (AK) zu einem bestimmten Antigen (Epitop). Die Bindung des Antikörpers an das entsprechende Epitop wird als Antigen-Antikörper-Reaktion bezeichnet. In der Regel kommt es zu einer spezifischen und starken Bindung zwischen Antikörper und Epitop. Der Antikörper, der gegen das zu untersuchende Epitop gerichtet ist, wird als Primärantikörper bezeichnet. Der Primärantikörper zeichnet sich in der Regel durch hohe Spezifität und Affinität aus und sollte keinerlei Kreuzreaktionen mit ähnlichen Epitopen aufweisen, die eine unspezifische Reaktion und somit eine unspezifische Färbung verursachen. In mehreren Teilschritten werden die einzelnen Komponenten des Detektionssystems dem Präparat zugeführt. Die immunhistochemischen Nachweise ermöglichen es, zellspezifische Strukturen und Anheftungsfaktoren genauer zu betrachten.

Das Ergebnis der Immunhistochemie ist in der Regel von mehreren Parametern abhängig. Die Art des Gewebes, die Fixierungsart und -dauer, die Vorbehandlungsmethoden, wie z.B. Antigen-Retrieval und die gewählte Einbettungsmethode für die Schnittherstellung sind wesentliche Faktoren, die einen Einfluss auf das Ergebnis der Immunhistochemie haben.

Die Antigen-Antikörper-Reaktion ist wiederum abhängig von der Temperatur, der Antikörperverdünnung, der Inkubationszeit, und dem optimalen Reaktionsmilieu (pH-Wert, Salzkonzentrationen).

2.10. Ziel der Arbeit

Die Transplantation humaner kornealer Endothelzellen eröffnet die beiden Optionen, zum einen Spenderhornhäute mit geringer Endothelzelldichte für Transplantationen geeignet zu machen, zum anderen, bei direkter Anwendung am Patienten in Fällen einer kornealen Endotheldystrophie, auf den Ersatz der kompletten Hornhaut zu verzichten. Zur Beurteilung des Langzeiterfolges einer derartigen Zelltransplantation stehen jedoch noch histologische Untersuchungen zur Anheftung der transplantierten Endothelzellen aus. Diese Untersuchungen werden dadurch erschwert, dass die Endothelzellschicht bei Gewebeschnitten von Hornhäuten nach einer Paraffineinbettung zumeist nicht in ihrer ursprünglichen Form erhalten bleibt. Ziel dieser Arbeit war es daher, ein Protokoll für die Einbettung humaner Hornhäute in Kunststoffharz und die Anfertigung von Gewebeschnitten zu erstellen, das eine Analyse der Anheftung transplantierte Endothelzellen ermöglicht. Da Kunststoffharze für Antikörper nicht durchlässig sind, sollte ferner untersucht werden, welche immunhistochemischen Färbungen, die vor einer Gewebeeinbettung durchgeführt werden, nach der Anfertigung der Gewebeschnitte noch deutlich erkennbar sind.

Zunächst wurden Hornhäute in verschiedene Kunststoffharze eingebettet und anhand der Gewebeschnitte die Gewebeintegrität in Abhängigkeit wesentlicher Parameter, wie Art der Gewebefixierung und Einbettungstemperatur mikroskopisch untersucht. Auf der Grundlage der dabei erzielten Resultate wurde ein optimiertes Protokoll zur Einbettung humaner Spenderhornhäute erarbeitet.

Im Anschluss erfolgten immunhistochemische Färbungen im Zusammenhang mit dem etablierten Protokoll und eine Überprüfung der Anwendbarkeit der immunhistochemischen Analyseverfahren.

3. Material und Methoden

3.1. Kultivierung von kornealen Endothelzellen

In dieser Arbeit wurden humane korneale Endothelzellen verwendet, die durch Transfektion mit dem Simian Virus 40 (SV40) immortalisiert waren (*Bednarz et al. 2000*).

Das Prozessieren der immortalisierten humanen kornealen Endothelzellen erfolgte unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 (HeraSafe) der Firma Heraeus. Die Kultivierung der Endothelzellen erfolgt bei 37 °C und 5,0 % CO₂ in einem water-jacketed Inkubator 325 (Forma Scientific).

Zum Umsetzen der Zellen wurde das alte Nährmedium mit einer Glaspipette und dem Vacu Safe (Integra Bioscience) entfernt und die Zellen im Anschluss dreimal mit je 5 ml Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Solution (PBS) ohne Calcium und Magnesium (Biochrome KG, Berlin) gewaschen. PBS-Puffer ist eine salzhaltige Pufferlösung die Natriumchlorid, Dinatriumhydrogenphosphat, Kaliumchlorid und Kaliumdihydrogenphosphat enthält. Die Eigenschaft als Puffer ermöglicht das Arbeiten bei einem konstanten pH. Die Konzentration der verschiedenen Salze ist so gewählt, dass die Lösung den im menschlichen Körper vorherrschenden osmotischen Druck aufweist, also isotonisch ist. Die primäre Anwendung in den Versuchen fand PBS als Reinigungslösung für Zellkulturen. Es wurde daneben auch zum Verdünnen von Chemikalien verwendet. Nach dem Waschen der Zellen wurde die Kulturschale (Costar, USA) mit 4-5 ml Trypsin/EDTA (0,05/0,02 %) (Invitrogen, Karlsruhe) befüllt und geschwenkt um eine gleichmäßige Verteilung des Trypsins über den Boden der Kulturschale zu gewährleisten. Im nächsten Schritt wurde die Kulturschale mit dem Trypsin/EDTA im Brutschrank (Heraeus) für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Der Inkubationsvorgang bei 37 °C garantiert eine optimale Enzymaktivität des Trypsins.

Nach 5 Minuten wurde die Kulturschale aus dem Brutschrank genommen und unter dem Mikroskop (Fluovort; Leitz) die Zellablösung kontrolliert. War die

Zellablösung unvollständig, so wurde der Arbeitsschritt mit frischem Trypsin wiederholt.

Im weiteren Verlauf wurde frisches Nährmedium (MEM-Alpha +Ribonucleoside +Desoxyribonucleoside, Invitrogen) mit 5 % Fetal Calv Serum (FCS; Biochrom), in die Kulturschale gefüllt und durch kurzes, zwei- bis dreimaliges Auf- und Absaugen wurden die abgelösten Zellen im Nährmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gefüllt und für 5 Minuten bei 100 rcf und 20 °C in einer Zentrifuge (Heraeus Sepatech, Omnifuge 2.0 RS) zentrifugiert.

Der Überstand wurde bis auf 1ml abgesaugt und die Zellen wurden in diesem verbliebenen Medium resuspendiert. Im nächsten Arbeitsschritt wurde frisches Nährmedium hinzugefügt. Anschließend wurden die mit ca. 15ml frischem Nährmedium verdünnten Zellen gleichmäßig auf mehrere Chamberslides verteilt. Der Rest der Zellsuspension wurde in eine Kulturschale überführt und für weitere Zellpassagen und Zellkultivierungen verwendet. Die Zellen wurden alle 3 Tage mit frischem Nährmedium versorgt.

3.2. Fixierung des Gewebes und kultivierter Zellen

Histologische Untersuchungen an eingebetteten Zell- und Gewebeproben gehören zu den grundlegenden Analysen in der medizinischen Diagnostik. Das Probenmaterial wurde zunächst in Paraformaldehyd, bzw. in 70 % Ethanol in 50 mM Glyzinpuffer pH2 fixiert und anschließend in Paraffin oder Kunststoff eingebettet.

3.2.1. PA-Fixierung der immortalisierten humanen kornealen Endothelzellen

Vor der Fixierung wurden die Chamberslides mit den sich darin befindenden Endothelzellen 3mal mit 250 µl PBS für je 5 Minuten gewaschen. Im Anschluss erfolgt die Fixierung mit 250 µl 4 % PA für 30 Minuten. Nachdem die Endothelzellen mit 4 %PA fixiert wurden erfolgten drei Waschgänge mit 250 µl

PBS für je 5 Minuten. Nachdem Wasch- und Fixierungsvorgang erfolgt die Vorbehandlung mit 0,5 % Triton für 2 Stunden. Danach wurden die Endothelzellen erneut 3mal mit 250 µl gewaschen und die Vorbehandlung abgeschlossen.

3.2.2. Fixierung von humanen Spenderhornhäuten

Die humanen Spenderhornhäute, die sich in einem 24 Well Cell Culture Cluster (Costar) befanden wurden zunächst dreimal mit PBS-Dulbecco (w/o Ca^{2+} , Mg^{2+}) für jeweils 5 Minuten gewaschen. Für die Waschvorgänge und das Pipettieren wurden kalibrierte Eppendorf Pipetten (1000 µl, 100 µl, 0,5-10 µl) und eine Eppendorfwaschpipette verwendet. Im Anschluss an den letzten Waschvorgang erfolgte die Gewebefixierung mit selbsthergestelltem 4 % Paraformaldehyd in PBS mit einem pH-Wert von 7,35 für 60 Minuten. Im Anschluss wurden die Präparate in 3 Waschgängen für jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen. Um die Gewebeporosität für die Antikörper zu erhöhen, erfolgte eine Behandlung mit 1 % Triton (Triton X-100; Aldrichs Chemical Co Ltd) in PBS für 3 Stunden. Im Anschluss wurde das Gewebe erneut dreimal in PBS gewaschen.

Sofern für das immunhistochemische Analyseverfahren das LSAB 2- System HRP-Kit (Dako Cytomation, USA) verwendet werden sollte, folgte eine Inhibierung der endogenen Peroxidase („Peroxidase-Block“) mit 3 % Wasserstoffperoxid (Merck, Darmstadt) für 60 Minuten, da endogene Peroxidasen das im Test verwendete Substrat für die Meerrettichperoxidase umsetzen und so ein falsch positives Ergebnis liefern können. Anschließend wurden die Spenderhornhäute dreimal à 5 Minuten mit PBS gewaschen.

Um einer möglichen Maskierung der Epitope, bzw. Antikörperbindungsstellen, entgegenzuwirken, wurde zur Demaskierung eine 0,1 % Pronase Lösung (BioPrime Biologo) verwendet. Im Anschluss an den 15 minütigen Inkubierungsschritt mit 0,1 % Pronase, erfolgte eine erneute dreimalige PBS-Waschung für jeweils 5 Minuten. Danach wurden die Gewebepreparate in PBS gelagert.

3.2.3. Fixierung der immortalisierten humanen kornealen Endothelzellen

Die Chamberslides wurden aus dem Inkubationsschrank genommen und das Nährmedium mit einer Glaspipette und dem Vacu Safe (Integra Bioscience) entfernt. Die Zellen wurden im Anschluss dreimal mit PBS gewaschen. Hinterher wurden die Endothelzellen mit 70 % Ethanol (Apotheke des Universitätsklinikums Hamburg–Eppendorf,) in 50mM Glyzinpuffer (pH2) für 30 Minuten bei -20°C fixiert. Später wurden die Chamberslides erneut dreimal mit PBS gewaschen. Im Gegensatz zu den humanen Spenderhornhäuten wurden die kornealen Endothelzellen nur 30 Minuten mit 1 % Triton (Triton X-100; Aldrichs Chemical Co Ltd) in PBS inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen. Sofern das LSAB 2- System HRP-Kit (Dako Cytomation, USA) verwendet werden sollte, folgte eine Inhibierung der endogenen Peroxidase („Peroxidase-Block“) mit 3 % Wasserstoffperoxid (Merck, Darmstadt) für 10 Minuten. Im Anschluss an den Wasserstoffperoxidschritt erfolgte ein dreimaliger PBS Waschvorgang, danach waren die Zellen fixiert und für immunhistologische Zwecke verwendbar. Sofern die Alkalische Phosphatase als Nachweissystem verwendet wurde, wurde für alle Waschschriffe TBS (Tris buffered saline) pH 7,4 anstelle von PBS verwendet, da die Verwendung von Phosphatpuffern zu einer Inhibierung der Alkalischen Phosphatase führen kann (Boenisch 2003).

3.3. Immunhistochemische Färbungen

Bei immunhistochemischen Färbungen wird zwischen einer direkten und einer indirekten Methode unterschieden. Im Gegensatz zur indirekten Methode ist bei der direkten Methode der Antikörper mit einem Detektionssystem gekoppelt, wodurch sein Vorhandensein im Präparat sichtbar gemacht wird. Die hier ebenfalls verwendete indirekte Methode, oder auch 2-Schritt Methode, ist sensitiver, da mehrere Sekundärantikörper mit verschiedenen Epitopen des Primärantikörpers reagieren und somit das Signal verstärken.

Material und Methoden

Bei der direkten Methode reagiert ein enzymgekoppelter spezifischer Antikörper mit einem bestimmten Gewebeeepitop. Der Antikörper bindet an das Antigen, nicht gebundener Antikörper wird anschließend abgespült. Dem Antigen und Antikörper(enzym)komplex wird ein Substrat angeboten, das unter Bildung eines Farbstoffes reagiert. Dieser Farbstoff bildet sich dort, wo die immunhistochemische Reaktion stattgefunden hat (Antigen + Antikörper mit Enzym + Substrat/Chromogen = Farbe).

Es gibt allerdings auch die Möglichkeit fluorchrom markierte Antikörper zu verwenden. Bei fluorchrom markierten Antikörpern erfolgt die Detektion direkt im Fluoreszenzmikroskop. Fluorchrom markierte Antikörper eignen sich gut zu Mehrfachdarstellungen unterschiedlicher Antigene in einem Präparat. Die AK werden mit Fluorchromen unterschiedlicher Emissionswellenlänge konjugiert. Die erste Anwendung der Immunfluoreszenz in der Immunhistochemie fand in den 50er Jahren statt.

Bei der indirekten Färbemethode, wie der hier verwendeten Labelled-Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB-Methode), reagiert ein biotinylierter Brückenantikörper mit einem Streptavidinmoleküle, welches mit alkalischer Phosphatase (AP) oder Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert ist.

Die LSAB Methode ist die Färbemethode, die heutzutage, am häufigsten Anwendung findet. Das Prinzip basiert auf der hohen Affinität von Streptavidin, (*Streptomyces avidinii*) für Biotin. Streptavidin besitzt jeweils vier Bindungsstellen für Biotin.

Bei dieser Methode wird im ersten Schritt ein spezifischer Primärantikörper auf die zu untersuchenden Zellen aufgebracht. Im zweiten Schritt wird ein weiterer Antikörper, der biotinylierte Sekundärantikörper (Link) aufgetragen. Der Sekundärantikörper richtet sich gegen den ersten Antikörper. Der zweite Antikörper, der biotinylierte Sekundärantikörper (Link) reagiert mit dem Streptavidin-Enzym Konjugat und löst mit einem geeigneten Substrat – Chromogen eine Farbreaktion aus. Es entsteht ein sichtbarer Farbstoff.

Bei den immunhistochemischen Färbungen kamen Primärantikörper sowohl aus der Maus als auch aus der Ratte zum Einsatz. Der Nachweis der Bindung dieser

Antikörper erfolgte durch enzymgekoppelte Nachweissysteme oder fluorochromgekoppelte Sekundärantikörper. Bei Primärantikörpern aus der Maus wurden als Nachweissysteme die LSAB-Systeme (Dako) eingesetzt, die mit Alkalischer Phosphatase (AP) bzw. Meerrettichperoxidase (eng. horseradish peroxidase, HRP) gekoppelt sind. Bei Primärantikörpern aus der Ratte kam das IG-HRP-System (BD Bioscience) zur Anwendung. Bei Verwendung des Nachweissystems mit Alkalischer Phosphatase wurde für alle Waschschriffe TBS (Tris buffered saline) pH 7,4 anstelle von PBS verwendet, da die Verwendung von Phosphatpuffern zu einer Inhibierung der Alkalischen Phosphatase führen kann (Boenisch 2003).

3.3.1. Immunhistochemische Färbungen mit kornealen Endothelzellen

Die kornealen Endothelzellen wurden wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben fixiert und anschließend dreimal in PBS/TBS gewaschen. Die Zellen wurden mit dem ersten Antikörper (AK) 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörper wurden mit Antibody-Diluent with Background Reducing Components (Dako Cytomation, USA) verdünnt. Die Antikörperverdünnung betrug 1:1000. Für die immunhistochemischen Versuche wurden Primärantikörper gegen folgende Proteine verwendet: CD29mouse (Klone K20 Dako, Dänemark), CD29rat (Purified Rat Anti-Human monoclonal Antibody, BD Bioscience), CD-49c (Alpha3- β 1 P1B5 Dako, Dänemark), Ki-67mouse (Klon MiB-1 Dako, Dänemark).

Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS oder TBS gewaschen. Bei Verwendung der LSAB-Methode erfolgte zunächst der Zwischenschritt mit einem biotinylierten-Brückenantikörper, dem so genannten Link, der eine Inkubationsdauer von 30 Minuten benötigte. Nach Inkubation mit dem biotinylierten Brückenantikörper wurden die Zellen einmal mit PBS oder TBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine 60-minütige Inkubation mit dem Streptavidin-Enzymkonjugat, der ebenfalls 1:1000 verdünnt wurde.

Zwischenzeitlich wurde eine Substrat-Chromogen-Lösung Permanent-Red für LSAB 2- System AP oder DAB (3,3' Diaminobenzidin; Dako Cytomation, USA) für LSAB 2- System HRP und Anti-Rat IG-HRP (BD Bioscience), hergestellt. Nachdem die Zellkulturen erneut mit PBS oder TBS für 5 Minuten gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation mit dem chromogenen Farbstoff, bis eine ausreichende Färbung, die mittels Mikroskop kontrolliert wurde, erreicht war. Der überschüssige chromogene Farbstoff wurde mit PBS oder TBS durch einen letzten Waschgang entfernt.

Bei der Verwendung von fluochrom-markierten Antikörpern erfolgte die Inkubation mit den Sekundär-Antikörpern ohne Zwischenschritt direkt nach den Waschungen im Anschluss an die Inkubation mit dem Primärantikörper. Folgende fluochromgekoppelte Sekundär-Antikörper wurden verwendet: goat-anti-mouse (polyclonal, FITC-konjugiert; Dako, Dänemark); anti-rat (monoclonal, Alexa555-konjugiert; Invitrogen); anti-rat (monoclonal, Alex-488-konjugiert; Invitrogen); anti-mouse (monoclonal, Alexa546-konjugiert; Invitrogen). Die Inkubationszeit für den Sekundärantikörper betrug jeweils 60 Minuten. Der nicht gebundene Antikörper wurde durch einen finalen Waschgang entfernt.

3.3.2. Immunhistochemische Färbungen mit humanen Spenderhornhäuten

Bei dieser Arbeit wurden humane Spenderhornhäute verwendet, die nicht zur Transplantation geeignet waren.

Die Antikörper, die bei der immunhistochemischen Färbung humaner Spenderhornhäute verwendet wurden, wurden 1:100 mit Antibody-Diluent (with Background-Reducing Components, Dako) verdünnt, welchem zuvor 1% Triton X-100 beigefügt worden war, um eine erhöhte Permeabilität der Antikörper im Gewebe zu erzielen.

Die humanen Spenderhornhäute wurden, wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, fixiert. Vor der Immunhistochemie wurden die Spenderhornhäute in mehrere gleiche Teile geteilt. Je nach Versuchsanordnung wurden die Hornhäute halbiert, geviertelt oder geachtelt. In seltenen Fällen wurden ganze Hornhäute mit den

Material und Methoden

betreffenden Antikörpern inkubiert. Die geteilten Spenderhornhäute wurden anschließend in 24 oder 96 Well Cell Culture Cluster (Flat Bottom with Lid, Tissue Culture Treated, Non-Pyrogenic, Polystyrene (Steril), der Firma Costar) überführt. Die weiteren Wasch- und Inkubationsvorgänge fanden in diesen Kulturschalen statt. Die Gewebeproben waren durchgehend mit den Wasch- und Inkubationsmedien bedeckt.

Für die monochromen Färbungen wurde das LSAB-2 HRP Kit verwendet. Für die monochromen Färbungen fanden CD-29m (Klone K20 Dako, Dänemark) und der Farbstoff DAB (3,3' Diaminobenzidin; Dako Cytomation, USA) Anwendung. Für die fluorochrom-markierten Färbungen wurden die Primärantikörper CD-29m (Klone K20 Dako, Dänemark) und CD-29r (Purified Rat Anti-Human monoclonal Antibody, BD Bioscience) verwendet, die fluorochrom-markierten Sekundär-Antikörper waren Alexa 546 (monoclonal mouse, Invitrogen) und Alexa 488 (monoclonal rat, Invitrogen).

Die Primärantikörper wurden 16 bis 18 Stunden mit den Spenderhornhäuten inkubiert. Da die LSAB-Methode Anwendung fand, wurde der biotinylierte Brückenantikörper, der als Zwischenschritt notwendig ist, für 3 Stunden mit den Hornhäuten inkubiert. Das Enzymkonjugat, die so genannte Streptavidin-Peroxidase wurde ebenfalls 3 Stunden mit dem Gewebe inkubiert. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten mit dem biotinylierten Brückenantikörper und dem Enzymkonjugat erfolgte ein dreimaliges Waschen für je 5 Minuten mit PBS. Anschließend erfolgt die Färbung mit 3,3' Diaminobenzidin (DAB; Dako Cytomation, USA). Die Färbungen durch die chromogene Lösung DAB wurde unter einen Mikroskop beobachtet, kontrolliert und nach erfolgter, ausreichender Färbung durch Waschen mit PBS/TBS gestoppt.

Bei der Verwendung von fluochrom-markierten Sekundär-Antikörpern erfolgte die Inkubation mit Alexa 546 (monoclonal mouse, Invitrogen) und Alexa 488 (monoclonal rat, Invitrogen). Die Primärantikörper wurden ebenfalls 16 bis 18 Stunden mit den Spenderhornhäuten inkubiert. Nach der Inkubation mit den Primärantikörpern wurde das Gewebe dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit den Sekundärantikörpern für 3 Stunden inkubiert. Die Zwischenschritte mit dem biotinylierten Brückenantikörper und Enzymkonjugat

finden hier keine Anwendung. Die nicht gebundenen Antikörper wurden durch einen finalen Waschgang entfernt.

3.3.3. Immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten humaner Spenderhornhäute

Die in PBS gelagerten Paraffinschnitte wurden dreimal in PBS gewaschen. Für die Immunhistochemie mit Paraffinschnitten wurde eine feuchte Kammer verwendet, um eine Dehydration des Gewebes zu vermeiden. Die Gewebe wurden mit einem Dako-Pen (Dako Cytomation, USA) markiert und mit Proteinase K (Dako Cytomation, USA) für 10 Minuten vorbehandelt. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte in einem PBS/TBS Bad dreimal für je 5 Minuten gewaschen. Sofern das LSAB 2-System HRP für die Immunhistochemie verwendet wurde, erfolgte der Inhibierungsschritt der endogenen Peroxidase mit 3% Wasserstoffperoxyd für 60 Minuten. Im Anschluss wurde das Gewebe dreimal mit PBS gewaschen und es erfolgte die Gabe des mit Antikörper-Diluent verdünnten ersten Antikörpers (Verdünnung 1:100). Die Inkubation mit dem ersten Antikörper dauerte 16 bis 18 Stunden. Die Inkubationszeiten für den 2. Antikörper dem biotinylierten Brückenantikörper (Link) und dem Enzymkonjugat (Streptavidin Peroxidase), betragen jeweils 3 Stunden.

3.3.4. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die in Paraffin eingebetteten Spenderhornhäute würden für 30 Minuten in Xylol (Fa. Sds) entparaffiniert. Im Anschluss wurde das Gewebe jeweils zweimal für je 3 min in 100% Ethanol, 96% Ethanol und 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurden die Proben für 3 min in dest. Wasser gewässert. Nun erfolgte die Färbung mit 1:10 verdünntem Hämatoxylin nach Harris (Merck). Danach erfolgte eine Spülung unter Leitungswasser. Um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen wurden die Proben für 5 Sekunden in Salzsäure-Ethanol (1l 96% Ethanol + 25ml 25%HCl Apotheke der Universität Hamburg-Eppendorf) differenziert. Der Salzsäure-Ethanol Rest wurde erneut durch dreimaliges Spülen mit

Leitungswasser entfernt. Das Gewebe wurde 30 Sekunden in Ammoniak-Wasser (200ml Wasser+ 1ml Ammoniak 25%) gebläut. Der restliche Farbstoff wurde durch dreimaliges Spülen mit heißem Leitungswasser entfernt und die Schnitte wurden anschließend für 20 Minuten gewässert. Nach dem Wässern wurde die Proben für 3 Minuten in 0,25% Eosin gefärbt und anschließend je zweimal für 3 Minuten in 96% Ethanol und 100% Ethanol gewaschen. Bevor die Proben weiterbehandelt werden konnten und/oder mit Eukitt (Fa. Kindler) eingedeckelt wurden, erfolgten 3 dreiminütige Ethanol-Xylol Waschgänge.

3.4. Einbettung von Geweben und Zellen in Acrylharze

3.4.1. Einbettung von humanen Spenderhornhäuten

Die immunhistochemisch behandelten humanen Spenderhornhäute wurden mit einer graduierten Alkoholreihe dehydriert. Es wurden jeweils zwei Dehydratationsvorgänge mit 70% Ethanol und absolutem Ethanol für jeweils 30 Minuten durchgeführt. Noch verbliebenes Wasser wurde dem Gewebe durch zwei Dehydratationsvorgänge mittels Chloroform (Riedel-de Haen) entzogen. Im Anschluss an die Chloroformbehandlungen erfolgten 3 Infiltrationsphasen mit L.R.-White (LR-White Acrylic Resin (Hard), LR-White Acrylic Resins; Sigma Aldrich; Steinheim) für je 45 Minuten. Am Ende der L.R.-White Infiltrationsphasen erfolgte die endgültige Einbettung des Gewebes. Für die Wärme induzierte Polymerisation wurden das mit L.R.-White infiltrierte Gewebe, in Gelatine-Hart-Kapseln (Größe "000"), farblos-klar und transparent (Plano GmbH; Wetzlar), überführt und mit frischem L.R.-White befüllt. Die Kapseln wurden verschlossen, um den Ausschluss von Sauerstoff zu gewährleisten und in einem handelsüblichen Kapselständer in einem Inkubationsofen der Firma Memmert (Schwabach) bei 60°C für 24 Stunden inkubiert.

Für die katalytische Polymerisation wurden ebenfalls Gelatine-Hart-Kapseln verwendet. Nachdem das Gewebe in die Kapseln überführt wurde, wurden 10ml frisches, gekühltes L.R.-White mit einem Tropfen (10µl) L.R.-White Acrylic Resin Accelerator (Sigma Aldrich; Steinheim) vermischt und in die Kapseln gefüllt.

Dabei sollte eine Blasenbildung vermieden werden. Anschließend wurden die Kapseln ebenfalls verschlossen und in einem Kühlschrank bei 4°C (Liebherr Germany) gelagert. Der Polymerisationsvorgang setzte unmittelbar ein und war nach 30 Minuten beendet.

3.4.2. Einbettung von kornealen Endothelzellen

Mit den kornealen Endothelzellen, die in Chamberslides ausgesät waren und die immunhistochemisch behandelt wurden, wurden ebenfalls Polymerisationsversuche unternommen, um Unterschiede der einzelnen Kunststoffe und die Unterschiede der Kunststoffe im Zusammenhang mit der Immunhistochemie zu erarbeiten.

Die kornealen Endothelzellen wurden ähnlich wie die humanen Spenderhornhäute für den Polymerisationsvorgang vorbereitet und mit einer aufsteigenden Alkoholreihe, mit 70% und abs. Alkohol jeweils 2-mal, gewaschen. Der bei den Spenderhornhäuten angewendete Zwischenschritt mit Chloroform wurde bei den in Chamberslides ausgesäten Zellen nicht durchgeführt. Im Anschluss an die Alkoholreihe erfolgten die L.R. White Infiltrationsphasen, die sich aus 3 Infiltrationsschritten à 10 Minuten zusammensetzten und jeweils mit frischem L.R. White erfolgten. Nach Beendigung der L.R. White Infiltration erfolgten die Wärme induzierte Polymerisation oder die katalytisch induzierte Polymerisation, entsprechend der Verfahrensweise bei humanen Spenderhornhäuten. Für die Wärme induzierte Polymerisation war es wichtig, den oberen Anteil des Chamberslides, inklusive der Isolierschicht zu entfernen, um unerwünschte Kunststoffpolymerisation, bzw. eine Interaktion der beiden verschiedenen Kunststoffe, zu vermeiden.

3.5. Anfertigung von Gewebeschnitten nach Kunststoffeinbettung

Nach vollständiger Polymerisierung des Kunststoffes wurden die Gelatine kapseln durch Waschen unter heißem Wasser aufgelöst, so dass nur noch der Kunststoffblock mit dem darin eingebetteten Gewebe übrig blieb. Der

kapselförmige Kunststoffblock wurde mit einer Modellbausäge in quaderförmige Gewebelöcher mit Seitenlängen von etwa 2,5 x 4,0 x 4,0 mm geschnitten. Die erhaltenen Gewebelöcher wurden mit Einkomponenten-Sekundenkleber Roti Coll 1 (Carl Roth GmbH; Karlsruhe) auf konfektionierte Eponklötzchen aufgeklebt und im Anschluss mit einem Ultramicrotom (Leica RM2165) geschnitten. Die Schnittstärke des Gewebes betrug 3 µm. Die Schnitte wurden auf SuperFrost/Plus Objektträger (Glaswarenfabrik Karl Hecht KG; Sondheim) aufgezogen.

3.6. Herstellung von Paraffinschnitten

Vergleichend zu den Kunststoffeingebetteten wurden in Paraffin (Paraffin mit einem Schmelzpunkt von 53-55°C; Shandon GmbH; Frankfurt, Germany) eingebettete humane Spenderhornhäute, gemäß dem folgenden Procedere, hergestellt.

Das Gewebe war entweder immunhistochemisch vor- oder unbehandelt. Das Gewebe wurde zunächst katalogisiert um eine spätere Zuordnung zu ermöglichen. Anschließend wurde das Gewebe in metallene Transferkapseln verpackt und diese in einen Paraffinisierungsautomaten (Shandon Citadel 2000) überführt. Die humanen Spenderhornhäute durchliefen eine steigende Alkoholreihe mit einmal 70% Ethanol, dreimal 96% Ethanol und einmal 100% Ethanol (Apotheke des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Germany). Durch drei Waschungen in Chloroform, wurde das Gewebe vollständig dehydriert. Jeder dieser Waschschritte dauerte eine Stunde. Dem Dehydrierungsvorgang schloss sich der Paraffinisierungsvorgang an. Es erfolgten zwei vollautomatische Paraffinschritte im Abstand von jeweils 2 und 3 Stunden.

Nach Beendigung des Paraffinisierungsvorganges wurden die Metallkapseln mit den sich darin befindlichen Spenderhornhäuten entnommen und in ein Paraffinwärmebad (Paraffinbad; Berlin-Hamburg) überführt. Dadurch war das Trennen des Gewebes von den Metallkapseln möglich. Als nächstes wurde mittels Metallwinkeln, die eine blockähnliche Form bildeten, das Gewebe in Paraffinblöcke gegossen. Es war darauf zu achten, dass die der zukünftigen Schnittfläche entsprechende Seite basal im Paraffinblock lag. Nach lagegerechter

Positionierung wurden die Metallwinkel über eine Paraffinausgussstation (Leica EG 1120) mit Paraffin befüllt. Im Anschluss wurden die noch flüssigen Paraffinblöcke auf einer Kälteplatte (Tissue Cool Plate COP 20) der Firma Medite gleichmäßig abgekühlt und danach in einem Tiefkühlschrank bei -4°C aufbewahrt. Die Paraffinblöcke wurden an einem Rotationsmikrotom (Leica; Wetzlar) auf 5µm geschnitten. Die Gewebeschnitte wurden in einem Wärmebad (Tissue Flotation Bad TFB 45) der Firma Medite Medizintechnik ausgebreitet und anschließend auf SuperFrost/Plus Objektträger aufgezogen.

Bevor die Paraffinschnitte für die Hämatoxylinfärbung und Immunhistochemie verwendet werden konnten, wurden sie entparaffiniert. Dazu wurden die Objektträger auf denen sich das Gewebe befand, bei 100°C für 30 Minuten im Ofen getrocknet. Abschließend wurden die Schnitte mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe, bestehend aus 100%, 96% und 70% Alkohol, jeweils für je 3 Minuten gebadet und danach mindestens 3 Minuten in destilliertem Wasser (Millipore-Reinstwasser-Anlage) gespült und in selbigem gelagert.

3.7. Antikörper (CD-29r, CD-29m, CD49c, Ki67)

Bei den hier vorgestellten Untersuchungen wurden Antikörper gegen CD-29, CD-49c und Ki67 verwendet. Bei CD-29 und CD-49c handelt es sich um zwei Proteine aus der Familie der Integrine, die im Folgenden kurz näher beschrieben werden.

Integrine sind Eiweißmoleküle, die in allen tierischen Zellen mit Ausnahme der roten Blutkörperchen vorkommen. Sie sind dauerhaft in der Zellmembran verankert und durchqueren diese. Sie zählen also zu den Transmembranproteinen, wobei der äußere Teil des Proteins an der Verbindung mit anderen Zellen (Zell-Zell Kontakte) sowie mit der Außenwelt (Zell-Matrix Kontakte) bzw. an der Signalübermittlung zwischen Zelle und Außenwelt beteiligt sein kann. Integrine gehören zu den heterodimeren transmembranösen Rezeptoren, d. h. sie bestehen aus zwei verschiedenen Proteinketten, einer alpha und einer beta Untereinheit. Es sind 18 α und 8 β Untereinheiten in Säugetieren bekannt (*Brakebusch und Fässler 2005*), die in unterschiedlichen Kombinationen

Material und Methoden

mindestens 24 verschiedene Integrine bilden können. Integrin beta-1 wird auch als CD-29 und Integrin alpha-3 als CD-49c bezeichnet, wobei CD als Abkürzung für cluster of differentiation steht.

CD29 ist involviert in Lymphozyten und Endothel Adhäsion. Zugleich begünstigt und/oder inhibiert CD29 Apoptose.

Ferner wurde ein Antikörper gegen ein Protein mit der Bezeichnung Ki-67 eingesetzt. Ki-67 gilt als Proliferationsmarker. Während des Zellzyklus wird dieses Antigen in der G1-, in der S-, in der G2- und in der M-Phase exprimiert. Ki steht dabei für Kiel und weist auf das Institut für Pathologie der Kieler Universität hin. CD-49c (Alpha3- β 1 P1B5 Dako, Dänemark) wird auch als VLA (very late antigen) alpha 3 chain bezeichnet. CD49 ist ein Rezeptor für Laminin, Kollagen, Fibronectin und Thrombospondin. Integrin alpha3beta1 gilt einer der Hauptrezeptoren für Laminin. Interaktionen von Zellen mit Laminin durch diese Integrine spielen eine wichtige Rolle bei der Zellanheftung, Differenzierung, Zellbeweglichkeit und Matrixanordnung (*Nishiuchi et al. 2003*).

Für die Immunhistochemie war die Anwendbarkeit verschiedener Antikörper von Bedeutung, um so unterschiedliche Strukturen gegeneinander abzugrenzen. Bei so genannten Doppelfärbungen waren zwei verschiedene Primär-Antikörper, z.B. monoclonal Maus [CD-29m, Ki-67m,] oder monoclonal Rat (CD-29r), Voraussetzung. Der Primärkörper war gegen ein spezifisches, zu untersuchendes Epitop gerichtet. Der Primärantikörper zeichnete sich durch hohe Spezifität und Affinität aus und durfte keinerlei Kreuzreaktionen mit ähnlichen Epitopen aufweisen. Der Sekundärantikörper war ausschließlich gegen den Primärantikörper gerichtet. Die anschließend verwendeten Sekundärantikörper waren nur gegen einen der zwei Primärantikörper gerichtet, damit keine unspezifischen Färbungen auftraten. Als Sekundärantikörper standen ebenfalls monoclonale Antikörper von Ratte (rat) [Alexa-546m] oder Maus (mouse) [Alexa-555r, Alexa-488r], sowie polyclonal goat (anti-mouse) [Anti-Mouse IgG Fitc] zur Verfügung. Die Sekundärantikörper reagierten ausschließlich mit ihren spezifischen Primärantikörpern. In den folgenden Abschnitten wurden die einzelnen Primär- und Sekundärantikörper miteinander kombiniert und Ihre

Anwendbarkeit in Bezug auf den Erhalt der Färbung nach Kunststoffeinbettung überprüft und dargestellt.

3.8. Fotodokumentation

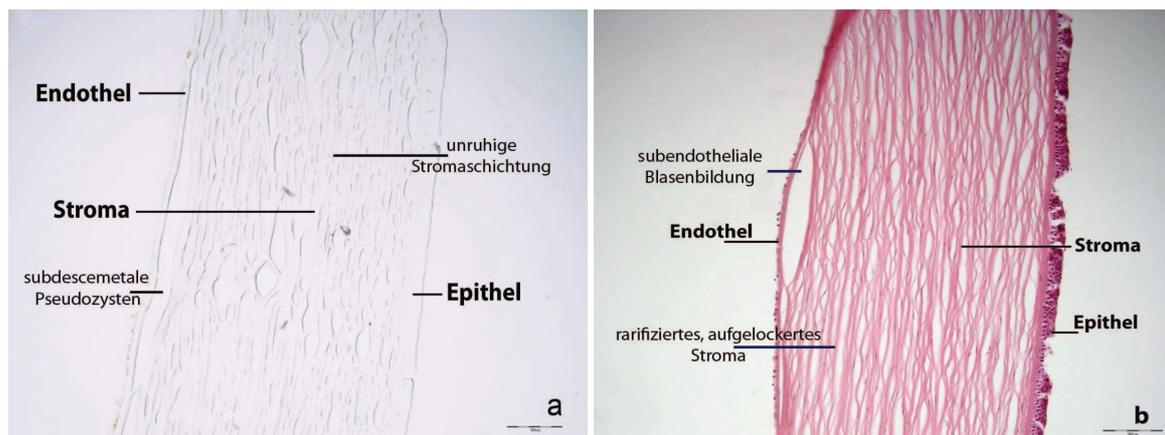
Für die Dokumentation der Ergebnisse wurden ein Standard Mikroskop Leitz (Fluovert) Fu, ein Computer und ein Phasen/Filter-Mikroskop Olympus IX 51 (Olympus Optical Co. Hamburg, Germany) mit angeschlossener Kamera und das Programm Analysis verwendet.

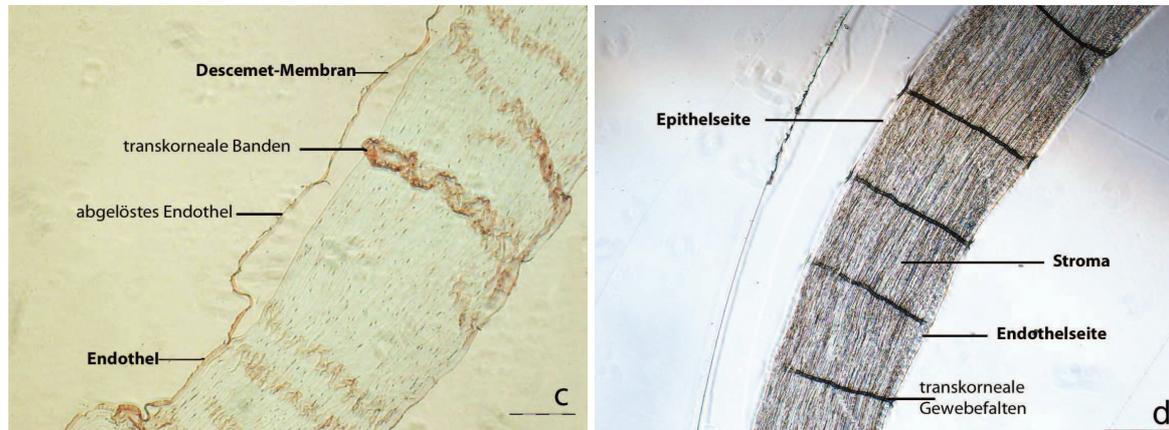
4. Ergebnisse

4.1. Paraffingewebeschnitte humaner Spenderhornhäute

Die Einbettung von Spenderhornhäuten und das Anfertigen von Gewebeschnitten aus diesen eingebetteten Hornhäuten können zu strukturellen Gewebeveränderungen führen.

Die Darstellungen in Abbildung 4.1 zeigen derartige Veränderungen in Schnitten von in Paraffin eingebetteten Hornhäuten. Das mehrschichtige, unverhornte Plattenepithel weist in den Schnitten eine irreguläre Oberfläche auf. Teilweise ist sie dehiszent und zeigt scheinbar subepitheliale Bullae. Die Bowmansche Membran zeigt sich kontinuierlich, jedoch in einzelnen Abschnitten des Hornhautscheibchens vom darunterliegenden Stroma gelöst. Das eigentlich reguläre, eng geschichtete kollagene, stromale Gewebe weist zahlreiche, optisch leer wirkende Hohlräume auf und wirkt insgesamt ödematös aufgetrieben. Die Descemet-Membran lässt sich regelhaft gut darstellen, jedoch erschweren artifizielle Abhebungs- und Umstülpungsartefakte die Beurteilung.





Abbildungen: 4.1a bis d: Übersichtsdarstellungen von Schnitten eingebetteter humaner Spenderhornhäute. Die Abbildung 4.1a zeigt einen Schnitt einer in Paraffin eingebetteten Hornhaut ohne Färbung. Abbildung 4.1b zeigt einen Hornhautschnitt nach HE-Färbung und Abbildung 4.1c einen Hornhautschnitt nach immunhistochemischer Färbung. Das Endothel ist in allen Fällen rarifiziert, scheinbare Pseudozystenbildung subendothelial, sowie subdescemetal. Die eigentlich parallel-kollagenen Stromaschichtung wirkt unruhig und weist zahlreiche Spalten auf. Die Gewebsarchitektur ist artifiziell zerstört. Die Endothelseite ist nicht kompakt dargestellt, sondern von der Descemet-Membran artifiziell abgelöst. Das Stroma ist aufgeworfen und zum Teil zerrissen. Vor allem Abbildung c und d zeigen scheinbar quer liegende, transkorneale Banden. (Die Schnittdicken betragen $5\mu\text{m}$, die Balkenlänge entspricht $200\mu\text{m}$). Zum Vergleich zeigt die Abbildung 4.1d einen Schnitt einer humanen, immunhistochemisch-gefärbten, in Kunststoff eingebetteten Spenderhornhaut, die abgesehen von quer liegenden transkornealen Banden, weitaus weniger Artefakte aufweist. Die histologische Architektur wirkt originalgetreuer. (Die Schnittdicke betrug $3\mu\text{m}$, die Balkenlänge betrug $100\mu\text{m}$).

Eine deutliche Veränderung ist auch im Bereich des Endothels zu erkennen. Die normalerweise dem Stroma eng anliegende Descemet-Membran ist in weiten Bereichen vom Stroma abgelöst. Diese Abhebung ist nach immunhistochemischer Behandlung noch deutlicher ausgeprägt. Die Abhebung der Descemet-Membran führt unter anderem in einigen Bereichen zu einer Verdrehung der Descemet-Membran, so dass diese sich im Präparat nicht durchgängig im Querschnitt zeigt, sondern teilweise die Endothelschicht oder die dem Stroma zugewandte Seite zu sehen ist.

Um die Darstellungen der einzelnen Einbettungsmethoden qualitativ zu beurteilen, wurden analog zu den kunststoffeingebetteten Hornhäuten auch von

in Paraffin eingebetteten Hornhäuten histologische Schnittpräparate angefertigt und untersucht.

Die Abbildungen 4.1a bis d zeigen Übersichtsdarstellungen humaner Spenderhornhäute. Die Schnittdicken der Präparate betrug 3 bis 5µm. Die Abbildungen 4.1a bis 4.1c zeigen in übersichtlicher Form die Schwierigkeit der Darstellung humaner Spenderhornhäute in Paraffinschnitten. Die Morphologie der einzelnen Zellschichten, Endothelzellschicht, Descemet-Membran, Stroma, Bowman-Membran und Epithelzellschicht, waren teilweise schwer beurteilbar. Die sensible und sich schnell ablösende Endothelseite war in den Darstellungen von der Descemet-Membran regelhaft abgelöst, zum Teil verdreht und dehiszent. Das Gewebe stellte sich ödematös und aufgequollen dar. Der Stromabereich war aufgeworfen, zeigte optische leere Hohlräume und war „zerrissen“ dargestellt. Die Abbildung 4.1.d zeigt zum Vergleich eine in Kunststoff eingebettete humane Spenderhornhaut.

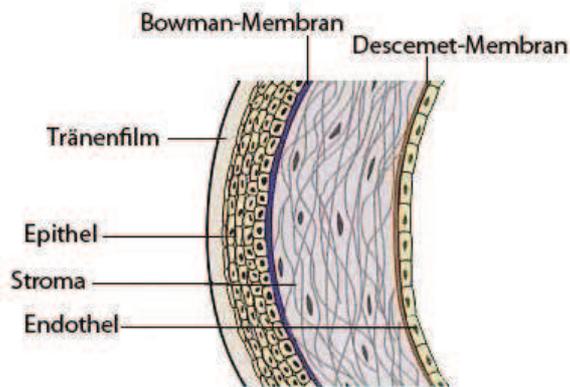
4.2. Kunststoffeinfbettung mittels Acrylkunststoffen

4.2.1. Acrylkunststoffe und Polymerisationsverfahren

Die in dieser Arbeit verwendeten Acrylkunststoffe waren L.R.-White Acrylic Resin (Hard) und L.R.-White Acrylic Resins.

Die folgende Abbildung, zeigt eine schematische Darstellung der einzelnen Hornhautschichten und soll eine Grundlage zur Orientierung für die in dieser Arbeit gewonnen Gewebeschnitte darstellen.

Ergebnisse



Schematischer Querschnitt: Schematische Darstellung eines Hornhautquerschnittes. Die Hornhaut besteht aus 5 verschiedenen Schichten: der Epithelschicht, der Bowmanschen-Membran, dem Stroma, der Descemet-Membran und der Endothelschicht.

(Abb.:

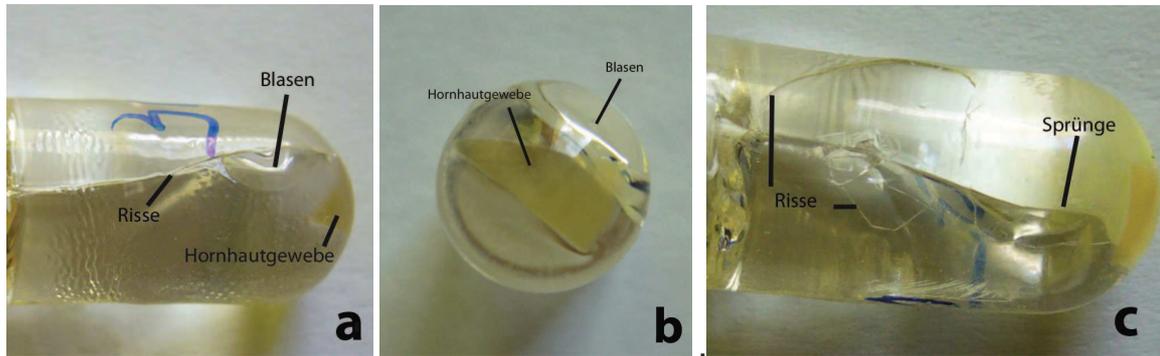
http://www.interlens.org/_img/cont_querschnitt_hornhaut.jpg; Stand 01.03.2007)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die zwei Acrylkunststoffe L.R.-White 1 (L.R.-White Acrylic Resin (Hard)) und L.R.-White 2 (L.R.-White Acrylic Resins) jeweils im Zusammenhang mit wärmeinduzierter Polymerisation oder katalytischer Polymerisation verwendet. Zur sprachlichen Vereinfachung wird L.R.-White Acrylic Resin (Hard) im Folgenden als L.R.-White 1 und L.R.-White Acrylic Resins, der weiche Kunststofftyp, als L.R.-White 2 bezeichnet. Bei der wärmeinduzierten Polymerisation war eine Temperatur von 60°C obligat, um eine vollständige Polymerisation zu erreichen. Wurde die Temperatur von 60°C um mehr als 4°C überschritten, so waren Blasen, Risse und Sprünge in den Kapseln zu beobachten (Abbildung 4.2a-c).

Bei der katalytischen Polymerisation waren keine Risse, bzw. Sprünge zu verzeichnen, lediglich Blasenbildungen waren zu erkennen.

Nach der Polymerisation waren die Kunststoffblöcke unterschiedlich transparent. Das eingebettete Gewebe war sichtbar und vom Kunststoff abgrenzbar (Abbildung 4.2). Anschließend wurden kleinere Blöcke ausgesägt bei denen das Gewebe in Bezug auf die spätere Schnittkante für die Gewebeschnitte genau ausgerichtet war. Hinsichtlich der Anfertigung der Gewebeschnitte beider Kunststofftypen ist zu erwähnen, dass der weichere Typ wesentlich einfacher zu schneiden war. Dagegen vermittelte der harte Kunststoff beim Transport vom Ultramicrotom auf den Objektträger einen wesentlich stabileren Eindruck.

Ergebnisse

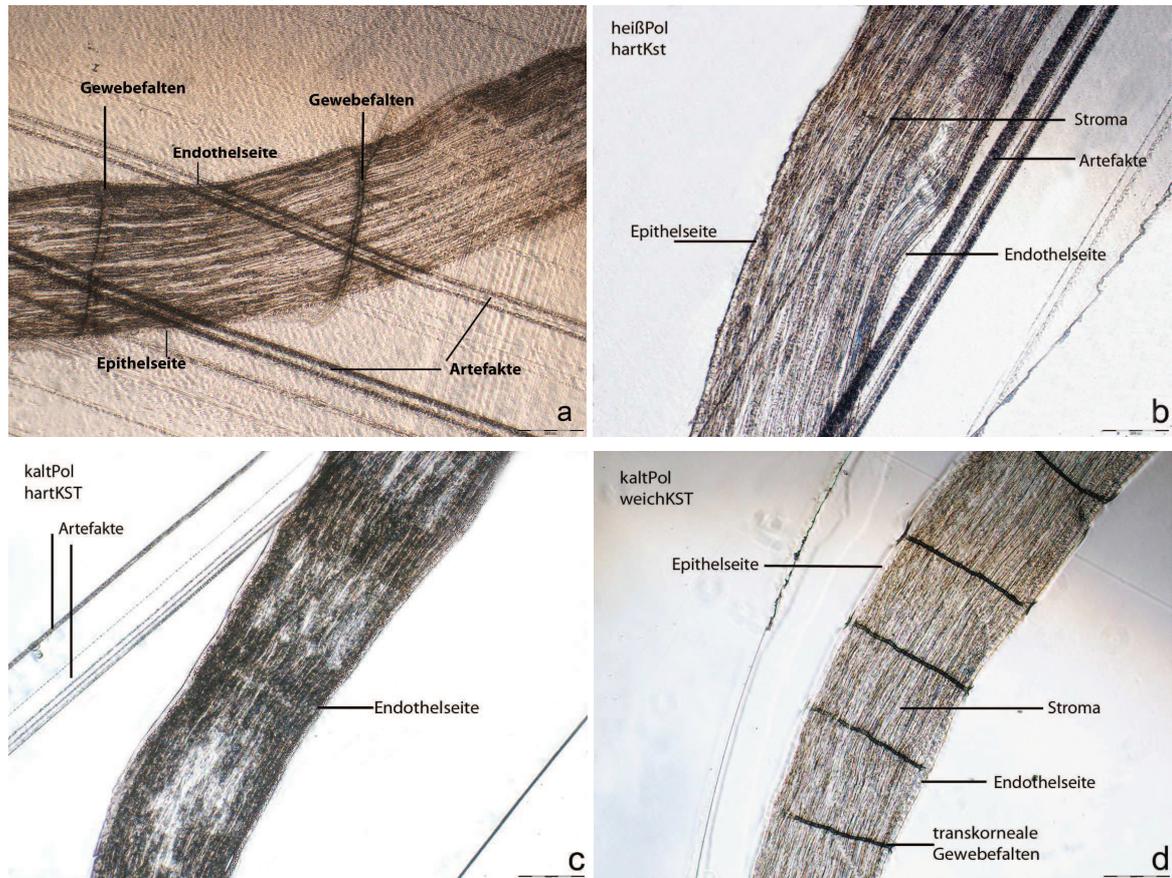


Abbildungen 4.2 a-c: Die Abbildungen a bis c zeigen die mit der wärmeinduzierten Polymerisation verbundenen Schwierigkeiten. Eine konstante Einbettungstemperatur von 60°C war Voraussetzung dafür, dass keine Blasenbildungen, Risse und Sprünge innerhalb der Kapseln und somit des Gewebes auftraten. Die Polymerisationstemperatur bei den in der Abbildung gezeigten Darstellungen lag bei 65°C.

Im Folgenden werden Gewebeschnitte aus den unterschiedlich hergestellten Blöcken hinsichtlich des Zustandes der Kunststoffe und das Auftreten offensichtlicher Einbettungsartefakte gezeigt. In den nachfolgenden Abschnitten werden Ergebnisse zu Hornhautschnitten, die aus Blöcken der vier unterschiedlichen Kombinationen von Kunststoff und Polymerisationsverfahren hergestellt wurden, getrennt dargestellt.

Die Abbildungen 4.2.1a-d stellen eine Übersicht der verschiedenen Kunststofftypen in Verbindung mit den Einbettungsmethoden dar. Die Abbildungen b und c zeigen humane Spenderhornhäute eingebettet in L.R.-White 1, die Abbildungen a und d zeigen Spenderhornhäute eingebettet in L.R.-White 2. Die Abbildungen a und b zeigen Wärme induzierte Polymerisationen, während die Proben c und d katalytisch polymerisiert wurden.

Ergebnisse



Abbildungen 4.2.1a-d: Schnitte von Spenderhornhäuten nach Einbettung in L.R.-White 2 (a und d) bzw. L.R.-White 1 (b und c). Die Polymerisation des Kunststoffes erfolgte durch Erwärmung der Proben auf 60°C (a und b) bzw. durch Zugabe eines Katalysators (c und d). Fehlende Transparenz, Sprödigkeit und/oder Risse, Kammerbildungen, Gewebefalten und Schnittartefakte waren entscheidende Merkmale, die nachfolgend näher betrachtet und differenziert wurden. War die Temperatur von 60° C überschritten so zeigten die Kapseln Risse und Sprünge (siehe Abbildungen 4.2 a –c). (Die Schnittdicken der Präparate betragen 3µm, die Balkenlänge entspricht 200µm.)

Bei Verwendung von L.R.-White 2 und wärmeinduzierter Polymerisation traten quer durch die Schnitte laufende, parallele Artefakte auf (Abb. 4.2.1a). Während der Kunststoffblock vorher klar und transparent war, zeigten die Gewebeschnitte eine verminderte Transparenz. Sie waren nicht vollständig klar und transparent, sondern zum Teil rissig bis spröde.

Die Hornhäute in den Abbildungen 4.2.1 a und d zeigten vertikal verlaufende, parallele Gewebefalten. Derartige Falten waren stets bei weich eingebetteten

Ergebnisse

Präparaten zu sehen. Die Abbildungen 4.2.1 c und d zeigen Spenderhornhäute die mittels der katalytisch induzierte Polymerisation eingebettet wurden. Die verminderte Sprödigkeit und erhöhte Transparenz der Präparate ist hier von wesentlicher Bedeutung. Eine hohe und gute Transparenz ist für die Anfertigung der Schnitte wichtig. Die Positionierung des Gewebes für die Schnittherstellung setzt eine Durchsichtigkeit/Transparenz des Einbettmediums voraus. Im Gegensatz zur wärmeinduzierten Polymerisation, wo die Transparenz der Kunststoffblöcke teilweise vermindert und spröde und rissig wirkte, wies die katalytisch induzierte Polymerisation stets eine gute Transparenz auf.

Bei Verwendung von L.R.-White 2 und wärmeinduzierter Polymerisation traten quer durch die Schnitte laufende, parallele Artefakte auf (Abb. 4.2.1a). Der Kunststoff selbst war nicht klar und transparent, sondern zum Teil rissig.

Die Hornhaut zeigte transkorneale, parallele Gewebefalten, die bei allen weich eingebetteten Präparaten zu sehen waren.

Unter Verwendung von L.R.-White 1 und katalytisch induzierter Polymerisation traten ebenfalls quer durch die Schnitte laufende, parallele Artefakte auf (Abb. 4.2.1c). Im Gegensatz zur wärmeinduzierten Form war der Kunststoff klar und transparent. Das Stroma war kompakt dargestellt. Das Endothel und das Epithel waren gut abgrenzbar und lagen der Bowman Membran und der Descemet-Membran auf. Im Vergleich zu den anderen humanen Spenderhornhäuten wies die Hornhaut in Abbildung 4.2.1c im Gegensatz zu den anderen Abbildungen, einen dunkleren Kontrast auf.

4.2.2. Hornhauteinbettung in L.R.-White 2 (L.R.-White Acrylic Resins weich) mit wärmeinduzierter Polymerisation

Bei Verwendung von L.R.-White 2 und wärmeinduzierter Polymerisation (Abb. 4.2.2a) traten parallele Schnittartefakte, transkorneale Gewebefaltungen und Pseudokammerbildung auf.

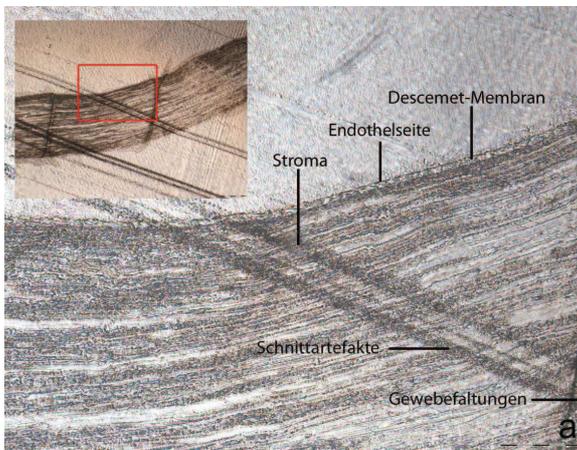


Abbildung 4.2.2a: Darstellung mit integrierter Ausschnittsvergrößerung: Zu sehen sind die Gewebeschichten: Endothel - Descemet-Membran – Stroma. Die dargestellte humane Spenderhornhaut wurde vor der Einbettung unter Verwendung des LSAB 2-System HRP Kit immunhistochemisch gefärbt, der Primärantikörper war CD-29m. Als chromogene Lösung wurde 3,3' Diaminobenzidin verwendet. Die Abbildung zeigt eine Spenderhornhaut nach Einbettung in

L.R.-White 2. Die Polymerisation des Kunststoffes erfolgte durch Erwärmung auf 60°C. Eine verminderte Transparenz, Sprödigkeit und/oder Risse, Kammerbildungen, transkorneale Gewebefalten und Schnittartefakte waren entscheidende Merkmale bei dieser Kombination. (Die Schnittdicke betrug 3µm, die Balkenlänge der Abb. 4.2.2a entspricht 100µm.)

Aufgrund des Ausschnittbereiches war die Gewebefaltung und die Kammerbildung am Übergang Stroma- Epithel- Kunststoff nicht zu erkennen. Die parallel laufenden Schnittartefakte waren deutlich zu erkennen. Der Kunststoff war in dieser Abbildung nicht durchgehend klar und transparent, sondern wirkte spröde und rissig. Die 3,3' DAB Färbung war schwer beurteilbar. Die zu untersuchenden Strukturen waren erkenn- und abgrenzbar.

4.2.3. Hornhauteinbettung in L.R.-White 1 (L.R.-White Acrylic Resin (hard)) mit wärmeinduzierter Polymerisation

Abbildung 4.2.3a zeigt eine in L.R.-White 1 in Kombination mit wärmeinduzierte Polymerisation eingebettete humane Spenderhornhaut.

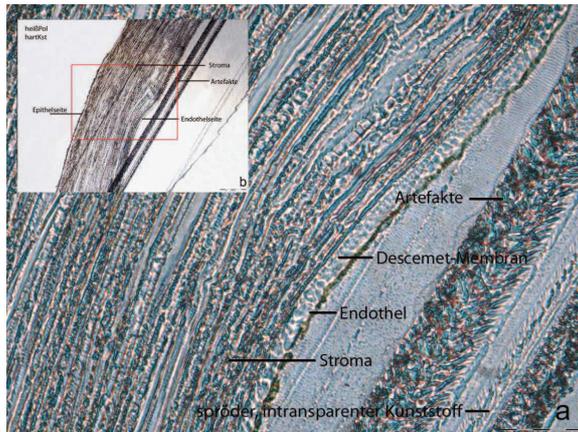


Abbildung 4.2.3a: Darstellung mit integrierter Ausschnittsvergrößerung: Zu sehen sind die Gewebeschichten: Endothel - Descemet-Membran - Stroma. Die in der Abbildungen a dargestellte humane Spenderhornhaut wurde mit dem LSAB 2-System HRP Kit behandelt, der Primärantikörper war CD-29m. Als chromogene Lösung wurde 3,3' Diaminobenzidin verwendet. Die Abbildung a zeigt eine Spenderhornhaut nach Einbettung in

L.R.-White 1. Die Polymerisation des Kunststoffes erfolgte bei einer Temperatur von 60°C. Transparenz, Sprödigkeit und/oder Risse, Kammerbildungen und Schnittartefakte waren entscheidende Merkmale. (Die Schnittdicke betrug 3µm, die Balkenlänge der Abb.4.2.3 a entspricht 50µm.)

Parallel verlaufende Artefakte waren in diesem Bildausschnitt erkennbar. Der Kunststoff, war in der Abbildung 4.2.3a nicht durchgehend klar und transparent, sondern war rissig und spröde. Die 3,3' DAB gefärbte Endothelzellschicht war von den anderen Gewebeschichten gut abgrenzbar und durchgängig dargestellt. Die Descemet-Membran war weder abgehoben, sondern lag dem Stroma kontinuierlich auf. Eine Pseudozystenbildung ist weder im subendothelialen noch subdescemetalen Bereich zu sehen.

4.2.4. Hornhauteinbettung in L.R.-White 1 und katalytisch induzierter Polymerisation

Die Darstellung (Abb. 4.2.4a) zeigt einen vergrößerten Ausschnitt eines Schnittes einer in L.R.-White 1 mittels katalytisch-induzierten Polymerisation eingebetteten Spenderhornhaut.

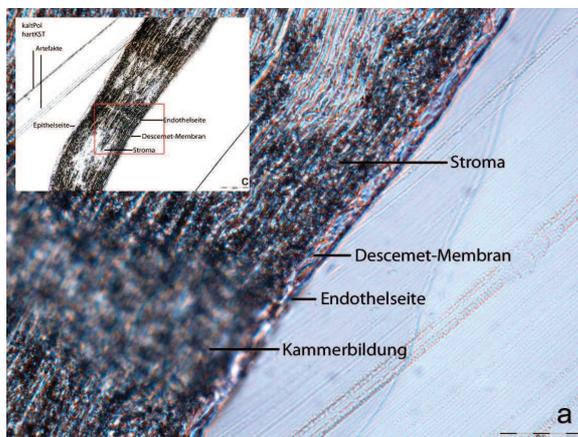


Abbildung 4.2.4a: Darstellung mit integrierter Ausschnittsvergrößerung: Die in der Abbildung a dargestellte humane Spenderhornhaut wurde mit dem LSAB 2-System HRP Kit behandelt, der Primärantikörper war CD-29m. Als chromogene Lösung wurde 3,3' Diaminobenzidin verwendet. Die Abbildung zeigt eine Spenderhornhaut nach Einbettung in L.R.-White 1. Die Polymerisation des Kunststoffs erfolgte durch Zugabe eines

Katalysators. Eine höhere Transparenz, verminderte Sprödigkeit und/oder Risse, Kammerbildungen und Schnittartefakte waren entscheidende Merkmale. (Die Schnittdicke betragen 3µm, die Balkenlänge der Abb. 4.2.4a entspricht 50µm.)

Im Vergleich zu den zwei vorangegangenen Darstellungen war der Kunststoff wesentlich klarer und transparenter. Die einzelnen Gewebeschichten waren eindeutig abgrenzbar. Die bereits beschriebenen parallel, verlaufenden Artefakte waren schwach sichtbar. Zum einen war die 3,3' DAB Färbung von den anderen Gewebeschichten schlecht abgrenzbar, zum anderen zeigte der Gewebeschnitt einen bereits beschriebenen, hohen und dunklen Kontrast. Die Endothelseite ist kompakt dargestellt und nicht von der Descemet-Membran abgelöst.

4.2.5. Hornhauteinbettung in L.R.-White 2 und katalytisch induzierter Polymerisation

Die Abbildung 4.2.5a zeigt L.R.-White 2 in Anwendung mit der katalytisch induzierte Polymerisationsform.

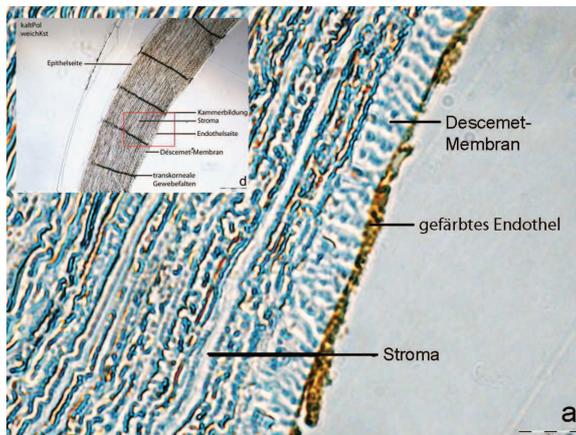


Abbildung 4.2.5a: Darstellung mit integrierter Ausschnittsvergrößerung: Zu sehen sind die Gewebeschichten: Endothel - Descemet-Membran - Stroma. Die in der Abbildung dargestellte humane Spenderhornhaut wurde mit dem LSAB 2-System HRP Kit behandelt, der Primärantikörper war CD-29m. Als chromogene Lösung wurde 3,3' Diaminobenzidin verwendet. Die Abbildung zeigt eine Spenderhornhaut nach Einbettung in

L.R.-White 2. Die Polymerisation des Kunststoffes erfolgte durch Zugabe eines Katalysators. Hohe Transparenz, fehlende Sprödigkeit und/oder Risse, Kammerbildungen, Gewebefalten und Schnittartefakte waren bei dieser Kombination sichtbar. (Die Schnittstärken betragen $3\mu\text{m}$, die Balkenlänge der Abb.4.2.5a entspricht $20\mu\text{m}$.)

Die Endothelseite lag rechts. Der Kunststoff selbst war klar und transparent. Die Hornhaut zeigt fünf transkorneal verlaufende, parallele Gewebefalten. Parallele Schnittartefakte waren in dieser Abbildung nicht zu erkennen. Die transkornealen Gewebefalten waren bei allen weich eingebetteten Präparaten zu sehen.

In diesem Gewebeschnitt waren keine Schnittartefakte sichtbar. Der Kunststoff war klar und transparent. Die immunhistochemische Markierung mit CD-29 und die Färbung mit der chromogenen Lösung 3,3' Diaminobenzidin war gut beurteilbar. Die Endothelseite zeigt durchgehend gefärbte Strukturen mit ausreichendem Kontrast und Zeichenschärfe. Die einzelnen Zellschichten sind kompakt dargestellt und lagen einander auf. Eine Ablösung der Descemet-Membran und der Endothelzellschicht konnte nicht beobachtet werden.

4.2.6. Zellkulturen im Zusammenhang mit der Kunststoffeinbettung (Eigenfluoreszenz)

Im Zusammenhang mit der Immunhistochemie und fluorochrom-markierten Antikörpern und der Heißpolymerisation trat sowohl in den Versuchsgruppen, als auch in den Kontrollen Fluoreszenz auf. Die Kontrollen wurden nicht mit dem ersten Antikörper inkubiert, so dass keine Bindung des Fluorochrom gekoppelten zweiten Antikörpers zu erwarten war. Daher stellte sich die Frage, ob die Fluoreszenz durch den Kunststoff oder sogar durch die Endothelzellen selbst hervorgerufen wurde. Die Endothelzellen waren für 30 Minuten mit 70 % Ethanol in 50 mM Glyzinpuffer (pH2) bei 20 °C fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen worden. Eine Inkubation humaner kornealer Endothelzellen bei 60 °C ohne Kunststoff führte nach 1,5 Stunden ebenfalls zu einer Fluoreszenz der Zellen (Abb. 4.2.6a-b).

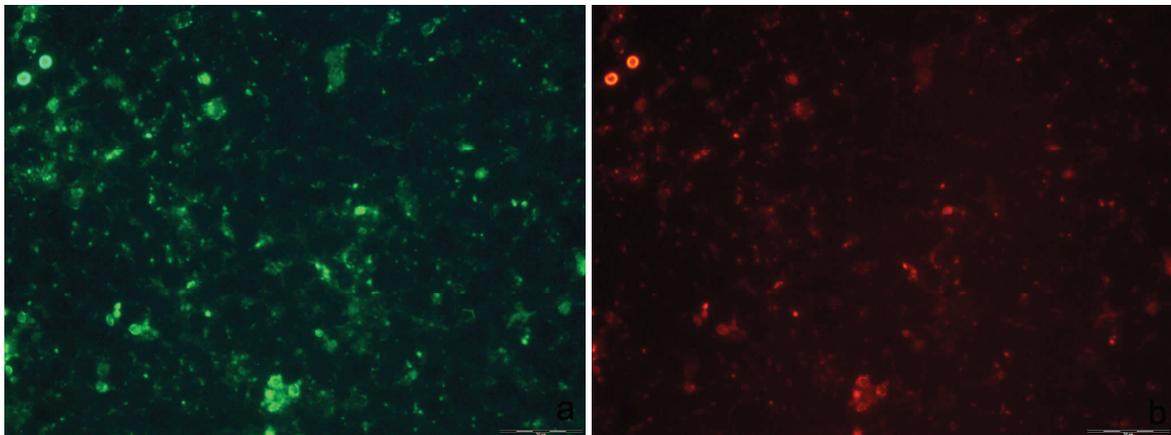


Abbildung 4.2.6a-b: Eigenfluoreszenz kultivierter humaner kornealer Endothelzellen: Es wurde eine Eigenfluoreszenz der Endothelzellen nach einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden bei 60 °C ohne Kunststoff beobachtet. Es traten sowohl eine Fluoreszenz im grünen Wellenlängenbereich (a) als auch im roten (b) Wellenlängenbereich auf. (Die Balkenlänge entspricht 50 µm.)

Auf Grund der beschriebenen Einbettungsverfahren und der in diesem Abschnitt beschriebenen Eigenfluoreszenz im Zusammenhang mit der wärmeinduzierten Polymerisation wurden im Anschluss alle weitergehenden Versuche mit dem Verfahren der katalytisch induzierten Polymerisation, der

Ergebnisse

Kaltpolymerisation, fortgeführt. Verwendet wurden sowohl L.R.-White 1 als auch L.R.-White 2.

Die Frage ob die Gewebeproben, die aus Kunststoffblöcken nach wärmeinduzierter Polymerisation hergestellt wurden, eine Eigenfluoreszenz aufwiesen, wurde anschließend kontrolliert. Gewebeproben die bereits polymerisiert waren, wurde unter das Fluoreszenzmikroskop gelegt und auf Eigenfluoreszenz untersucht.

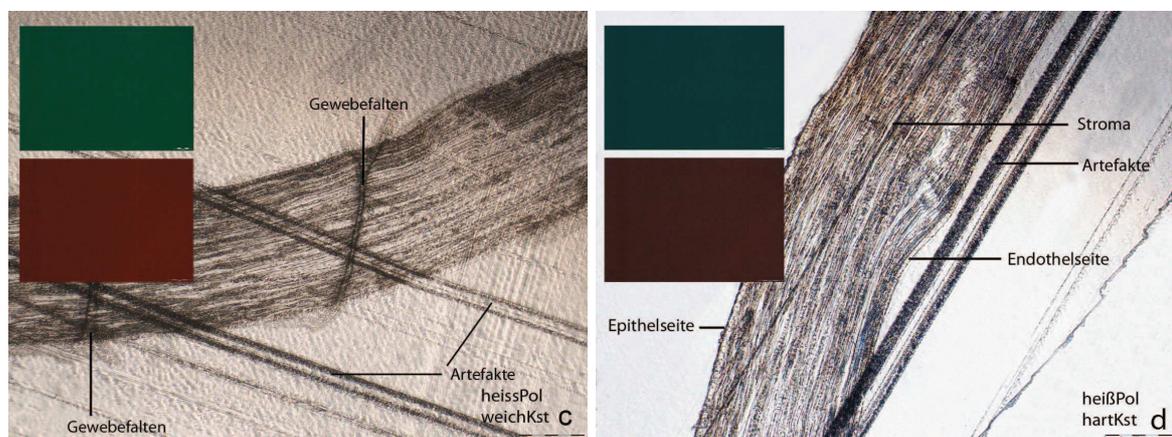


Abbildung 4.2.6c-d: Die folgenden Abbildungen zeigen humane, mittels wärmeinduzierte-Polymerisation behandelte Spenderhornhäute, die auf Eigenfluoreszenz untersucht wurden. In den vorliegenden Schnitten ließ sich keine Fluoreszenz nachweisen. Die Abbildung c zeigt eine Hornhautscheibe eingebettet in L.R.-White 2 mittels wärmeinduzierter Polymerisation. Die Abbildung d zeigt eine Hornhaut eingebettet in L.R.-White 1 mit wärmeinduzierter Polymerisation. In der linken oberen Ecke werden die gleichen Schnitte im Fluoreszenzkanal, einmal in rot und grün dargestellt. In dem vorliegenden Versuch zeigte sich keine Eigenfluoreszenz, daher erscheinen die Inlets homogen rot, bzw. grün. Es wurde keine Eigenfluoreszenz der Endothelzellen nach einer Inkubation bei 60°C beobachtet. Es trat keine Fluoreszenz im grünen Wellenlängenbereich (a) als auch im roten (b) Wellenlängenbereich auf. (Die Balkenlänge entspricht 50µm.)

Eine Eigenfluoreszenz der wärmeinduzierten polymerisierten Gewebeproben wurde nicht beobachtet.

4.3. Fixierung von Zellkulturen

Zu Beginn wurden die verwendeten Zellkulturen in 4% Paraformaldehyd (PA) fixiert. Nach der Fixierung der Zellen erfolgte die Immunhistochemie. Anfangs waren die Färbungen sehr unbefriedigend. Es war ein Signal vorhanden, jedoch war die Signalstärke sehr schwach. Ein möglicher Grund war die Art der Fixierung, die daraufhin umgestellt wurde.

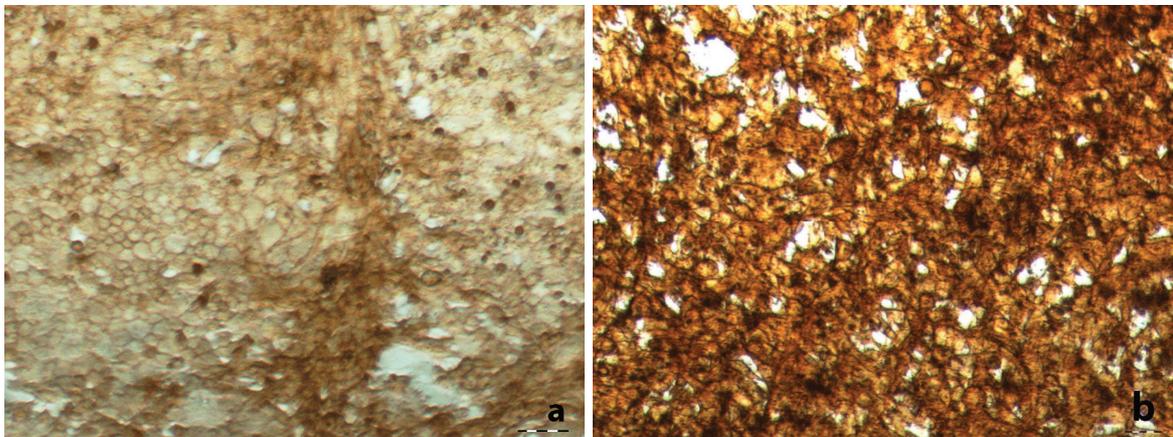


Abbildung 4.3a-b: Die Abbildungen a und b zeigen anti-CD-29 markierte und mit 3,3' Diaminobenzidin gefärbte Endothelzellen. Abbildung a zeigt 4 % PA fixierte Endothelzellen mit einem schwachen Signal. Eine Färbung ist nur an den Zell-Zell-Kontakten zu erkennen. Die Abbildung 4.3b zeigt Ethanol 70 % in 50mM Glyzinpuffer (pH2) fixierte Endothelzellen mit einer stärkeren Färbung der gesamten Zelloberfläche. Dies entspricht der Lokalisation des CD-29. (Die Balkenlängen entsprechen 100µm (Abb. 4.3a) und 50µm (Abb. 4.3b)).

In weiteren Versuchen wurden die humanen kornealen Endothelzellen dann für 30 Minuten bei -20 °C mit Ethanol 70 % in 50 mM Glyzinpuffer (pH2) fixiert. Die veränderte Fixierung mit einem Ethanol/Glyzinpuffer verbesserte die Immunocytochemie und die Signalstärke. Der Grund dafür war die verminderte Quervernetzung der Zellen und eine bessere Zugänglichkeit für den ersten Antikörper. Um die Gewebegängigkeit für den ersten Antikörper zu erhöhen, wurde das Gewebe mit einer 1 % Triton-Lösung vorbehandelt. Die Antikörper, die mit Antibody-Diluent (with Background Reducing Components) verdünnt wurden, wurden zusätzlich mit 1 % Triton-Lösung verdünnt, um so die Signalstärke zu erhöhen.

Nachdem die Zellfixierung und die Antikörperverdünnung anhand der humanen kornealen Endothelzellen methodisch optimiert wurden, erfolgte die Immuncytochemie mit verschiedenen ersten und zweiten Antikörpern. Die Verwendung verschiedener Färbelösungen, chromogene und fluoreszierender Farbstoffe, wurden im Zusammenhang mit dem L.R.-White Kunststoff untersucht, um zu sehen ob die einzelnen Farbstoffe und Antikörper kunststoffstabil waren. Dabei wurden vor und nach der Kunststoffeinfbettung die Färbungen beurteilt und dokumentiert.

4.4. Färbungen mit monochromen Lösungen (Diaminobenzidin und Permanent-Red)

4.4.1. Diaminobenzidin vor und nach Kunststoffeinfbettung

Die in Abbildung 4.4.1a und b dargestellten Zellkulturen wurden mit anti-CD-29 inkubiert und mit dem LSAB-2 HRP Kit (Dako) behandelt. In der Abbildung 4.4.1a zeigte der Farbstoff 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) eine gleichmäßige und durchgehende Färbung.

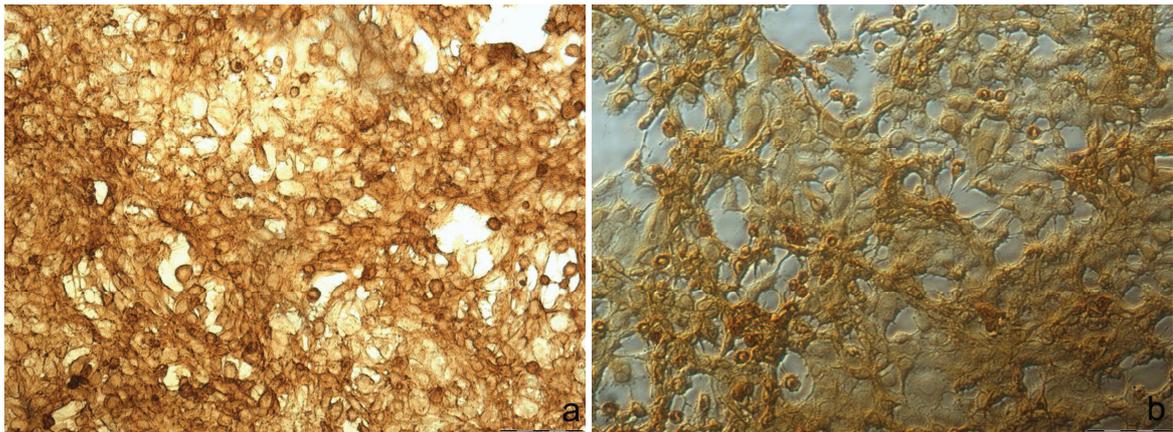


Abbildung 4.4.1a-b: Die Abbildung 4.4.1a zeigt die kultivierten Endothelzellen vor der Kunststoffeinfbettung. Der verwendete Kunststofftyp war L.R.-White 1. Die Polymerisationsform war die wärmeinduzierte Form. Die Abbildung 4.4.1b zeigt die humanen kornealen Endothelzellen nach erfolgter Einbettung. Der erste Antikörper war anti-CD-29 im Zusammenhang mit dem LSAB-2 HRP Kit (Dako). Der verwendete Farbstoff war 3,3' Diaminobenzidin (DAB). (Die Balkenlänge entspricht 100µm.)

Ergebnisse

Die Zelldichte der humanen kornealen Endothelzellen wurde durch die Kunststoffeinfbettung nicht wesentlich beeinflusst (Abbildung 4.4.1b). Das Ausmaß der immunocytochemischen Färbung war vergleichbar und wurde also durch die Kunststoffeinfbettung nicht beeinträchtigt. Die Negativkontrollen, die nicht mit anti-CD-29 jedoch mit dem zweiten Antikörper inkubiert wurden, zeigten keinerlei unspezifische Färbungen vor und nach der Kunststoffeinfbettung (Abbildung 4.4.1c und d).

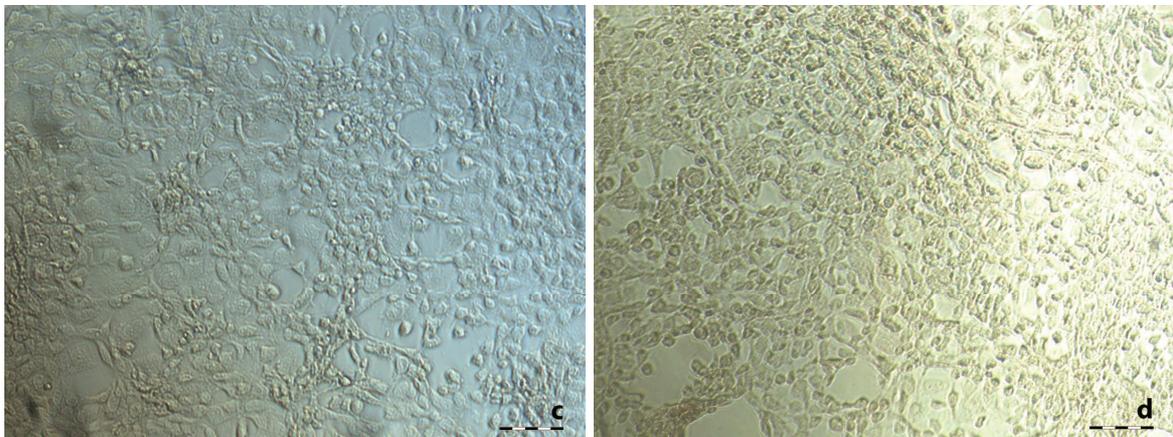


Abbildung 4.4.1c-d: Negativkontrollen vor (Abb. 4.4.1c) und nach der Kunststoffeinfbettung (Abb.4.4.1.d). Der verwendete Farbstoff war 3,3' Diaminobenzidin (DAB). (Die Balkenlänge entspricht 100µm.)

4.4.2. Permanent Red vor und nach Kunststoffeinfbettung

Die in den folgenden Abbildungen gezeigten humanen kornealen Endothelzellen wurden mit anti-CD-29 inkubiert. Der für diese Färbung verwendete Farbstoff, im Zusammenhang mit dem LSAB 2-AP Kit von Dako, war Liquid Permanent Red (Dako).

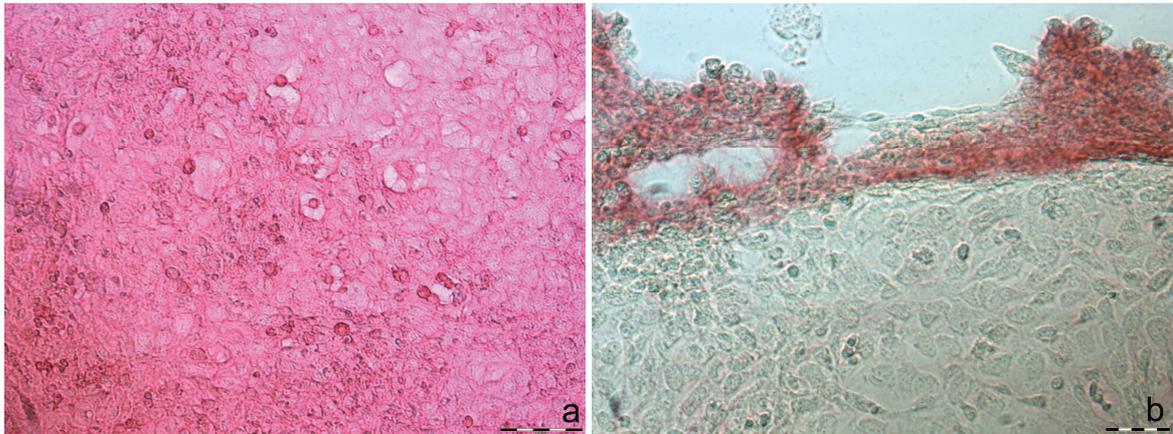


Abbildung 4.4.2: Humane korneale Endothelzellen vor (a) und nach (b) der Kunststoffeinfettung. Der erste Antikörper war anti-CD-29. Die Visualisierung erfolgte mit dem LSAB-2 AP Kit (Dako). Der verwendete Farbstoff war Permanent Red (Dako). (Die Balkenlängen entsprechen 100 µm).

Die Abbildung 4.4.2a zeigt eine gleichmäßige Färbung. Die Abbildung 4.4.2b zeigt die humanen kornealen Endothelzellen nach Kunststoffeinfettung. Der obere Teil des Bildes zeigt einen durch mechanische Vorgänge zum Teil abgelösten Endothelbereich. In diesem Grenzbereich zeigten die Zellen nach der Kunststoffeinfettung immer noch eine gewisse Färbung. Der adhärenzte Zellanteil, der im unteren Teil des Bildes zu sehen war, wies nur eine sehr schwache Färbung auf. Der Farbstoff Permanent-Red war zum Teil verschwunden und somit nicht kunststoffstabil.

4.5. Färbungen mit Fluoreszenzfarbstoffen

4.5.1. FITC vor und nach der Kunststoffeinfettung

Die kommenden Abbildungen zeigen fluoreszenz-markierte Endothelzellen vor und nach der Kunststoffeinfettung. Der verwendete Primärantikörper war anti-CD-29. Der fluorochrom-markierte Sekundärantikörper war mit dem Farbstoff FITC gekoppelt, der bei Anregung grünes Licht emittiert. Die Abbildung 4.5.1b zeigt fluorochrom-markierte Endothelzellen nach erfolgreicher Kunststoffeinfettung. In Abbildung 4.5.1 sind transmembranöse Proteine mit dem Primärantikörper, anti-CD-29, markiert worden, die Zellgrenzen lassen durch den

Ergebnisse

sekundären fluorochrom-markierten Antikörper (FITC) sehr gut in Abbildung a erkennen. Auch nach erfolgter Kunststoffeinfbettung (b) lassen sich die Zellmembranen verlässlich darstellen, wenn auch mit vermindertem Kontrast und Zeichenschärfe.

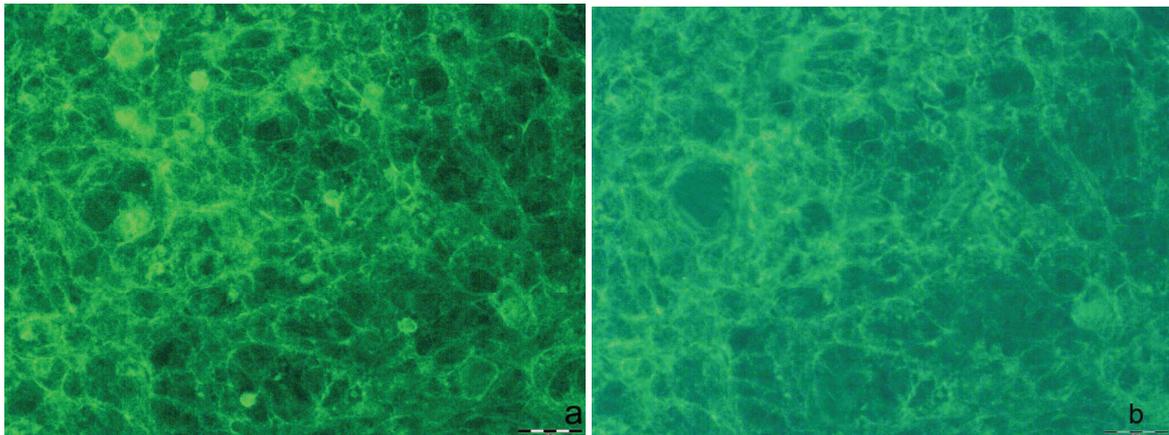


Abbildung 4.5.1a und b: Humanen kornealen Endothelzellen vor und nach der Kunststoffeinfbettung. Der erste Antikörper (anti-CD-29) im Zusammenhang mit dem fluorochrom-markierten Antikörper (FITC; Dako). Abbildung 4.5.1a zeigt die Endothelzellen vor der Kunststoffeinfbettung, die Abbildung 4.5.1b zeigt die Endothelzellen nach der Kunststoffeinfbettung.

In den Negativkontrollen (Abbildung 4.5.1c und d) band der sekundäre Antikörper an keinerlei Zellstrukturen.

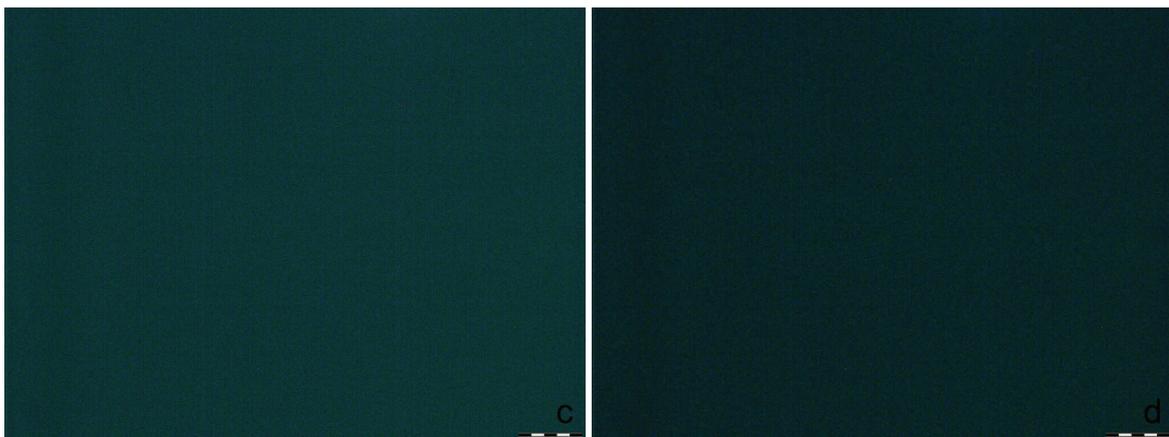


Abbildung 4.5.1c-d zeigt die Negativkontrollen ohne Kunststoffeinfbettung (kein anti-CD-29), bzw. kein FITC. (Die Balkenlängen entsprechen 20 μm .)

4.5.2. Alexa 555 vor und nach der Kunststoffeinbettung

Die Abbildungen 4.5.2a und b zeigen ebenfalls fluorochrom-markierte Endothelzellen. Der Primärantikörper war anti-CD-29. Die Abbildungen a und b zeigen den Zustand vor (a) bzw. nach (b) der Kunststoffeinbettung. Auch der zweite sekundäre Antikörper (Alexa 555, Invitrogen) zeigt gute Fluoreszenzsignale an den zu erwartenden Gewebestrukturen, sowohl in dem nativen als auch kunststoffeingebetteten Präparat.

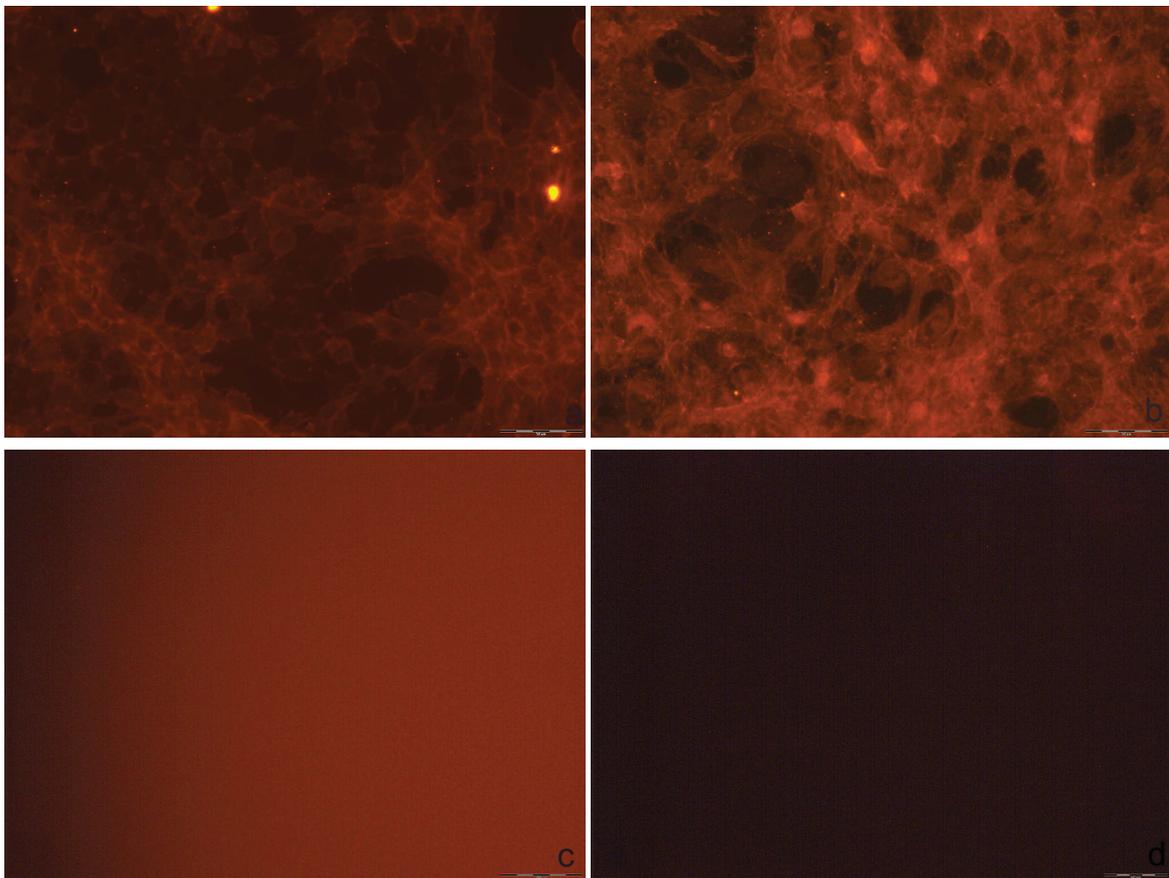


Abbildung 4.5.2a-d: Humane kornealen Endothelzellen vor und nach der Kunststoffeinbettung. Der erste Antikörper (anti-CD-29) im Zusammenhang mit dem fluorochrom-markierten Antikörper (Alexa555, Invitrogen). Abbildung 4.5.2a zeigt die Endothelzellen vor der Kunststoffeinbettung, die Abbildung 4.5.2b zeigt die Endothelzellen nach der Kunststoffeinbettung und die Abbildungen 4.5.2c-d zeigt die Negativkontrollen (kein CD-29m, bzw. kein Fitc). (Die Balkenlänge entspricht 50 μm)

Dieser fluoreszierende Antikörper, Alexa 555, emittierte rot/braunes Licht. Die Negativkontrolle wiesen keine spezifischen Signale auf.

4.5.3. Doppelfärbung mit Alexa488 und Alexa 555 vor und nach Kunststoffeinbettung

Die Abbildung 4.5.3a zeigt eine Doppelfärbung vor Kunststoffeinbettung mit zwei unterschiedlichen Primärantikörpern und dazugehörigen Sekundärantikörpern. Die Abbildung 4.5.3a war eine computertechnische Überlagerung der zwei kleineren Bildausschnitte, die sich im oberen linken Teil der Abbildung befinden. Der obere linke Bildausschnitt zeigt Endothelzellen, die mit dem Primärantikörper Ki-67 und dem Sekundärantikörper Alexa 555 inkubiert wurden und eine rote Fluoreszenz zeigten. Der untere linke Bildausschnitt zeigt Endothelzellen, die mit dem Primärantikörper anti-CD-29 und dem Sekundärantikörper Alexa 488 inkubiert wurden und eine grüne Fluoreszenz aufwiesen. Im Anschluss wurden die beiden Bildausschnitte mit Hilfe des Computers überlagert, um so die unterschiedlich gefärbten Strukturen zu vergleichen.

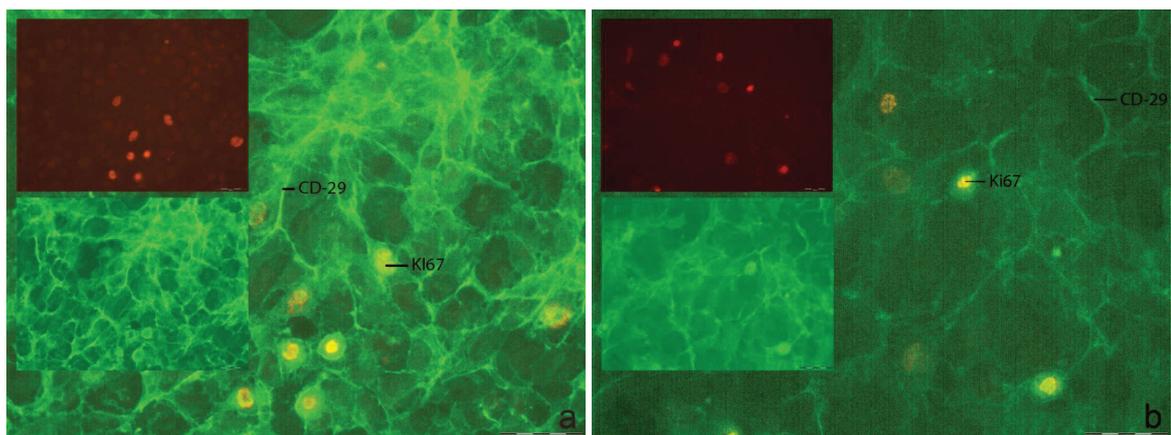


Abbildung 4.5.3: Doppelfärbung der humanen kornealen Endothelzellen vor und nach Kunststoffeinbettung. Die ersten Antikörper (anti-CD-29, Ki-67) im Zusammenhang mit dem fluorochrom-markierten Antikörpern (Alexa555, Alexa 488; (Invitrogen)). Die in den Abbildungen a und b eingebetteten Bildausschnitte (Inlets), zeigen die Einzelfärbungen Ki-67 und Alexa555 (rot Kanal), sowie anti-CD-29 und Alexa 488 (grün Kanal), inkubierte Endothelzellen. Die Einzelabbildungen wurden dann mit Hilfe des Computers überlagert und stellen die Abbildungen 4.5.3 a und b dar. Die Abbildung 4.5.3 a zeigt die humanen kornealen Endothelzellen vor der

Kunststoffeinbettung, die Abbildung 4.5.3 b zeigt die humanen kornealen Endothelzellen nach der Kunststoffeinbettung. Der Kontrast und die Auflösung sind nach der Kunststoffeinbettung, in Abbildung 4.5.3b, vermindert. (Die Balkenlänge entspricht 50 µm.)

Die durch Ki-67 markierten Zellkerne proliferierender Endothelzellen wurden auf Grund der Überlagerung gelb dargestellt. Die zellulären Strukturen, die mit anti-CD-29 markiert wurden, erschienen grün.

Die in Abbildung 4.5.3b beschriebene Doppelfärbung mit den Primärantikörpern anti-CD-29 und Ki-67 wurde in Kunststoff eingebettet.

Die Primärantikörper anti-CD-29 und Ki-67 und die fluorochrom-markierten Sekundärantikörper Alexa 555 und Alexa 488 erwiesen sich als kunststoffstabil. Eine Doppelfärbung mittels fluorochrom-markierten Sekundärantikörpern und eine anschließende Einbettung des Gewebes in Kunststoff ohne Verlust der durch die immunhistochemische Färbung erzielten Fluoreszenz waren möglich.

Der Kontrast und die Auflösung sind in der Abbildung 4.5.3b vermindert. Die farblichen Signale waren nach der Kunststoffeinbettung reduziert.

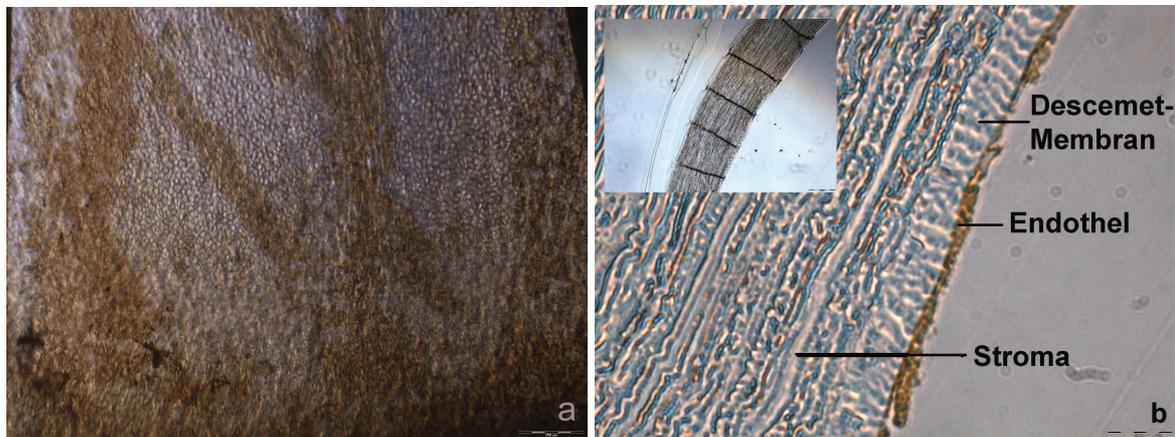
4.6. Einbettung von Spenderhornhäuten nach immunhistochemischer Färbung

Im Anschluss an die Versuchsreihen mit den humanen kornealen Endothelzellen erfolgte die Anwendung der erlangten Erkenntnisse auf humane Spenderhornhäute. In den folgenden Abschnitten werden die Spenderhornhäute ebenfalls vor und nach der Kunststoffeinbettung beschrieben.

Für die Immunhistochemie wurden die Spenderhornhäute in Viertel- oder Achtelstücke zerteilt. Nach erfolgter Immunhistochemie wurden die Teilstücke in Kunststoff eingebettet und anschließend wurden histologische Schnitte angefertigt.

4.6.1. Monochrom gefärbte humane Spenderhornhäute vor- und nach der Kunststoffeinbettung

Die Abbildung 4.6.1a zeigt eine mit anti-CD-29 inkubierte Hornhaut. Die Färbung erfolgte mit dem LSAB 2-System HRP und dem Farbstoff 3'3 Diaminobenzidin (DAB). Die Färbung der Hornhäute war nie durchgängig und gleichmäßig, wie es bei den humanen kornealen Endothelzellen der Fall war, trotz der Antikörperverdünnung mit 1 % Triton.



Abbildungen 4.6.1a-b: Die Aufsicht (Abb. 4.6.1a) zeigt eine humane Spenderhornhaut nach erfolgter Immunhistochemie und vor der Kunststoffeinbettung. Die Endothelseite war mit einem Antikörper gegen CD-29 inkubiert worden. Die Hornhaut wurde mit 3,3' Diaminobenzidin (DAB) gefärbt. In Abbildung a (Aufsicht auf das Endothel) war die Färbung nicht durchgängig und gleichmäßig. Es gab Bereiche die übermäßig gefärbt waren und Bereiche in denen die Färbung geringer ausgeprägt war. (Die Balkenlänge in der Abbildung 4.6.1a entspricht 200µm.). Die Abbildung b zeigt einen Querschnittes durch gleiche Hornhaut wie in Abbildung a. Die Hornhaut wurde jedoch vor dem Schneiden mittels katalytischer Polymerisation in L.R.-White 2 eingebettet. Die Strukturen: Endothel, Descemet-Membran und Stroma (Abb. 4.6.1b) waren gegeneinander abgrenzbar. (Die Balkenlänge der zweiten Abbildung entspricht 100 µm.)

Die ungleichmäßig ausgeprägte Färbung der Spenderhornhaut lässt sich durch die artefaktbedingte Wölbung des Präparates und der gewählten Bildschärfenebene erklären.

Auf Grund der artefaktbedingten Wölbung des Präparates kam es zu Auswaschungsphänomenen des primären und sekundären Antikörpers und unterschiedlichen Markierungsintensitäten. Diese wiederum sind deutlich zu

unterscheiden von den unterschiedlichen Markierungsintensitäten, die durch die gewählte Bildschärfenebene in der Abbildung resultieren.

Wie in der Abbildung zu sehen war, gab es Bereiche die eine übermäßige Färbung zeigten und Bereiche in denen die Färbung geringer ausgeprägt war. Die CD-29 inkubierte und DAB gefärbte Hornhaut, wie die Abbildung 4.6.1a zeigte, wies Bahnen mit einer dunkelbraunen Färbung auf. Die CD-29 inkubierten Hornhäute hatten eine ausgeprägte Braunfärbung im Limbusbereich. Bei dieser Hornhaut war lediglich die Endothelseite immunhistochemisch behandelt. Die Epithelseite der Hornhaut wurde mit keinem Antikörper inkubiert, deshalb konnte auf dieser Seite keine immunhistochemische Färbung stattfinden.

Die einzelnen Strukturen waren gut dargestellt und voneinander abgrenzbar. Die Strukturen waren dicht und kompakt und eine Ablösung des Endothels von der Descemet-Membran wurde nicht beobachtet. Die Descemet-Membran lag durchgehend dem Stroma auf. Die Färbung mit 3,3' Diaminobenzidin (DAB), die auf der Endothelseite zu erkennen war, war vom Rest des Gewebes abgrenzbar. Die Abbildung 4.6.1b zeigte eine Vergrößerung der Endothelseite und lieferte eine genauere und deutlichere Darstellung, über die zu untersuchenden Strukturen. Die Endothelzellen stellten sich abgeflacht und nicht kubisch dar. Die mit anti-CD-29 inkubierten und mit DAB gefärbten Endothelzellen waren klar von der Descemet-Membran abgrenzbar. Die Descemet-Membran setzte sich gut von dem Rest der Strukturen ab und war gut dargestellt. Das Stroma wirkte nicht aufgeworfen, sondern war kompakt. Die Epithelfaltungen, die senkrecht zum Querschnitt der Hornhaut verliefen, wurden durch die Verwendung des L.R.-White 2 verursacht und wurden zuvor bereits beschrieben.

4.6.2. Fluoreszenz-markierte humane Spenderhornhäute vor und nach Kunststoffeinbettung

Die Abbildungen 4.6.2a-d zeigen eine mit CD-29r, CD-29m und mit fluorochrom-markierten Antikörpern (Alexa 488 und Alexa546) inkubierte Hornhaut. Zu sehen ist eine Aufsicht der Endothelseite der Hornhaut.

Ergebnisse

Auf Grund der nicht-ideal sphärischen Beschaffenheit des Präparates kommt es bei der gewählten Schärfenebene zur einzelnen Darstellung von Endothelzellverbänden, die aus der Schärfenebene davor- oder dahinterliegenden Zellen scheinen verwaschen und nicht-markiert. Wählt man den Fokus jedoch etwas tiefer oder höher im Gewebe so lassen sich auch die scheinbar nicht markierten Zellen mit einer kräftig markierten Fluoreszenz darstellen.

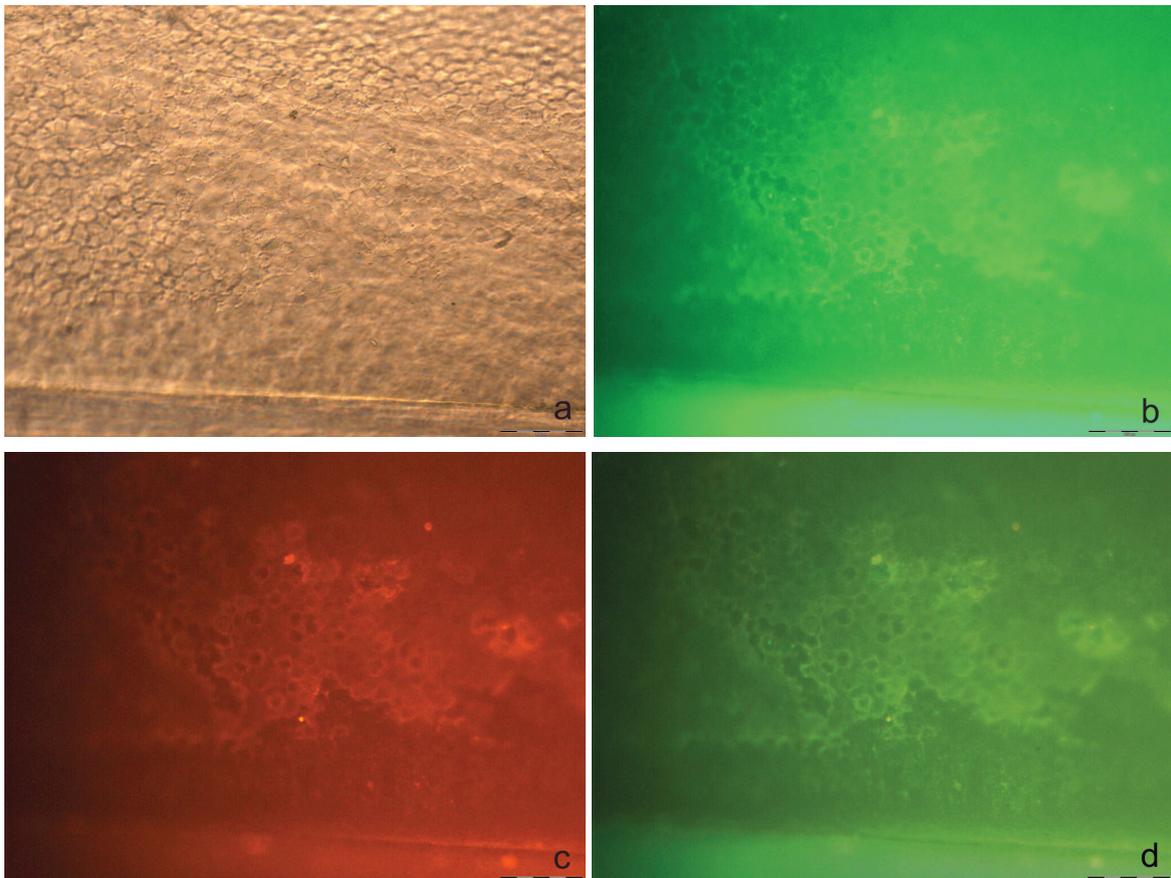
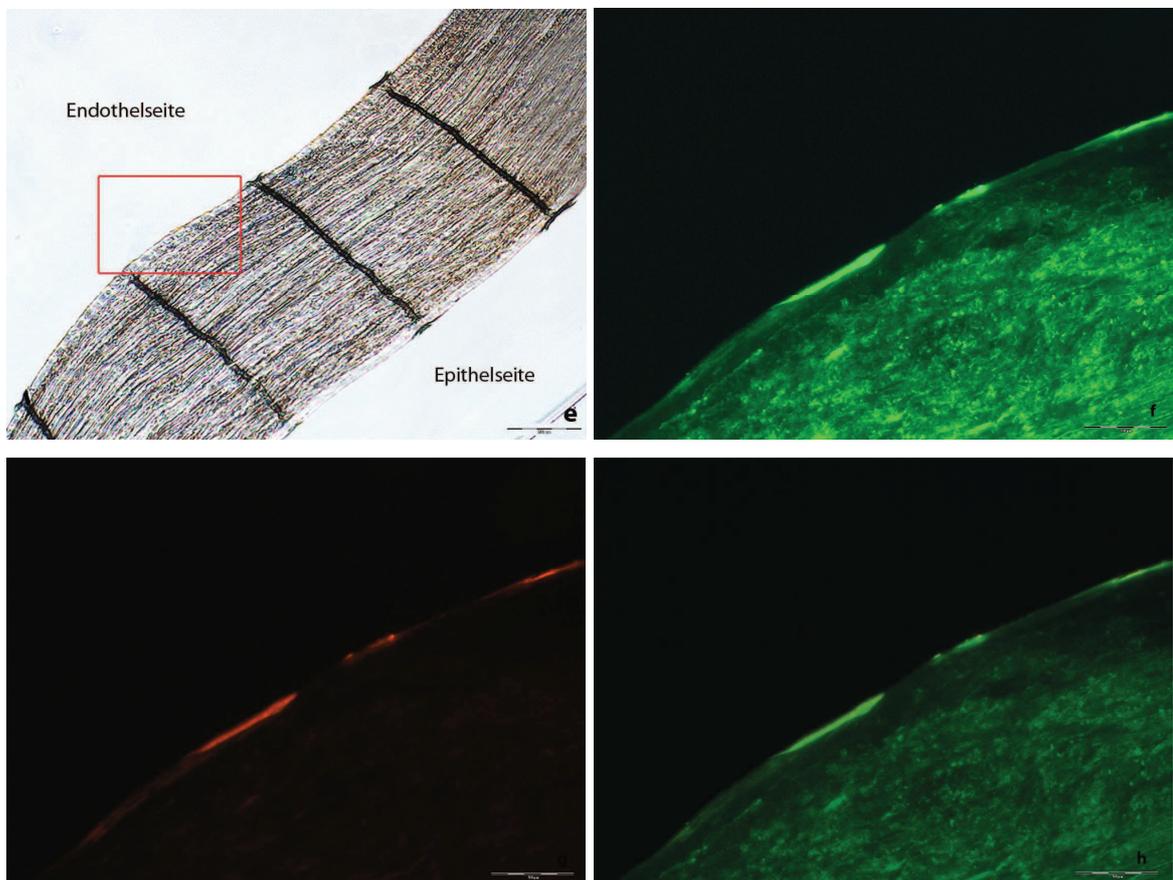


Abbildung 4.6.2a-d: Übersichtsdarstellung der Endothelseite eines Spenderhornhautstückes nach erfolgter Immunhistochemie und vor der Kunststoffeinfbettung. Die Primäantikörper waren gegen CD-29. Abbildung a-d zeigt jeweils den gleichen Ausschnitt eines Präparates. In der Abbildung 4.6.2b ist eine immunhistochemisch-gefärbte Spenderhornhaut (Aufsicht) zusehen. Die Primäantikörper war CD-29r in Kombination mit dem fluorochrom-markierten Antikörper Alexa 488. Abbildung 4.6.2c zeigt eine mit CD-29m und dem fluorochrom-markierten Antikörper Alexa 546 inkubierte Hornhaut. Die Abbildung 4.6.2.d stellt eine computer-technische Überlagerung der beiden vorangegangenen Abbildungen dar. Bei allen Abbildungen handelt sich um Aufsichten einer Spenderhornhaut vor Kunststoffeinfbettung. (Die Balkenlänge entspricht 100 µm.)

Ergebnisse

Die Abbildung 4.6.2a zeigte eine lichtmikroskopische Darstellung der Spenderhornhaut. Die Abbildungen 4.6.2b und c stellten die Endothelseite mittels der fluorochrom-markierten Antikörper Alexa 488 und Alexa 546 dar. Die Abbildung 4.6.2d war eine mit dem Computer durchgeführte Überlagerung der Abbildungen 4.6.2b und c. Das Endothel war in allen Abbildungen gut zu erkennen. Abbildungen 4.6.2b-d zeigen deutlich, dass die Färbung vor allem an den Zellgrenzen auftritt. Diese Beobachtung erklärt, warum in Abbildung 4.6.2.e die Färbung des Endothels nicht kontinuierlich ist, weil der Querschnitt teilweise durch den Bereich zwischen zwei Zellen geht, wo starke Färbung vorhanden ist und teilweise quer durch eine Zelle geht, wo kaum Färbung auftritt.

Die Darstellungen in den folgenden Abbildungen zeigen eine immunhistochemisch behandelte humane Spenderhornhaut. Der Kunststoff war L.R.-White 2 das Einbettungsverfahren war die katalytisch-induzierte Polymerisation. Die fluorochrom-markierten Antikörper, Alexa 546 und 488, zeigten keinerlei Veränderungen nach der Polymerisation.



Ergebnisse

Abbildung 4.6.2.e-h: Darstellung eines Querschnittes durch eine immunhistochemisch gefärbte Spenderhornhaut. Die Primärantikörper waren gegen CD-29. Die Hornhaut wurde mit den fluorochrom-markierten Antikörpern Alexa 546 und Alexa 488 inkubiert und mit katalytischer Polymerisation und L.R.-White 2 prozessiert. Die Abbildung e zeigt eine Übersicht der Spenderhornhaut (Balkenlänge 300µm). Die Abbildung f zeigt eine mit dem fluorochrom-markierten Antikörper, Alexa 488, gefärbte Endothelseite. Die Darstellung g zeigt eine Färbung mit Alexa 546. (Die Balkenlänge der Abbildungen f-h entsprechen 50µm.) Die computer-technische Überlagerung der Abb.f und g ist in der Abbildung 4.6.2.h dargestellt. (Balkenlänge entspricht 50µm).

Eine Übersicht der Spenderhornhaut wird in der Abbildung 4.6.2e dargestellt. Sie enthält ebenfalls den später dargestellten Ausschnittsbereich der anderen Abbildungen. Der Sekundärantikörper Alexa 488 zeigte im Gegensatz zu dem Sekundärantikörper Alexa 546 eine höhere Hintergrundfärbung. Die Färbung des Stromas wirkt dominanter. Die Lokalisation der Signale war identisch und wurde durch den Kunststoff nicht verändert. Die histologischen Schnitte stellen eine sinnvolle Anwendung von L.R.-White dar. Das Gewebe ist nicht artifiziell zerstört, zeigt keinerlei Gewebeablösungen, oder Pseudozysten. Zugleich ist die immunhistologische Färbung durch das Procedere nicht beeinträchtigt worden. Eine Abgrenzung der darzustellenden histologischen Strukturen ist möglich.

5. Diskussion

Die Acrylkunststoffe hielten 1949 ihren Einzug und sind noch heute ein wesentliches Hilfsmittel in der Licht- und Elektronenmikroskopie. Neben Epoxiden gelten Methacrylate als Mittel der Wahl für Licht- und Elektronenmikroskopie.

Der wesentliche Vorteil bezogen auf den höheren Antikörpernachweis in L.R.-White Schnitten gegenüber Epon Schnitten wurde bereits von *Newman (1989)*, *Wilson et al. (1996)* und *Brorson (1994)* beschrieben

Über Jahre wurden diverse L.R.-White Einbettungsprotokolle im Bezug auf verschiedene Gewebe verfeinert und justiert, doch bis zum heutigen Tage gibt es kein allgemeingültiges Standardprotokoll für Gewebeproben.

5.1. Diskussion der Problematik der Paraffineinbettung

Die Paraffineinbettung, welche als Standardeinbettungsmethode gilt, ist rasch und einfach durchzuführen. In Paraffin eingebettete Gewebe können beliebig lange konserviert und aufbewahrt werden. Ein Nachteil des Paraffins besteht jedoch darin, dass das Gewebe während der Durchtränkung eine beachtliche Schrumpfung (8 - 20 %) erfährt. Ein wesentlicher Nachteil ist die verminderte Gewebemorphologie, bzw. Gewebearchitektur. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse unterstreichen die Schwierigkeiten in Bezug auf den Erhalt der Gewebemorphologie, die Art der Einbettungsmethode und die Anwendbarkeit der Immunhistochemie.

Die Ergebnisse zeigen eine völlig unbehandelte, in Paraffin eingebettete Spenderhornhaut. Die ungefärbte, in Paraffin eingebettete humane Hornhaut zeigte bereits nach Einbettung und somit vor der Färbung eine verminderte Gewebemorphologie. Die Hämatoxylin-Eosin Färbung, kurz HE-Färbung, gilt als Routinefärbung in der Histologie und ermöglicht die Darstellung gewisser Strukturen wie zum Beispiel saure, basophile Zellkerne (blau) und Zellplasmaproteine (rot). Die HE gefärbten Schnitte zeigten humane Spenderhornhäute mit einer verminderten Gewebearchitektur. Die Präparate wiesen keine kompakten Strukturen auf. Zum Teil waren Ablösungen des

Endothels, der Descemet-Membran und Ablösungen des Epithels zu erkennen. Das Stroma war nicht kompakt dargestellt und stellte sich sowohl vor als auch nach der Färbung aufgeworfen dar. Anzumerken ist das die Gewebemorphologie bereits vor der Färbung vermindert war und somit der Vorgang der Paraffinisierung einen erheblichen Einfluss auf die Gewebearchitektur hat. Die dritte Abbildung, die immunhistochemische Färbung, zeigt das Immunhistochemie an humanen in paraffin-eingebetteten Hornhäute möglich ist, aber die Interpretation des Gewebes, auf Grund der verringerten Gewebestruktur, erschwert wird.

5.2. Diskussion der Methodik

5.2.1. Fixierung der humanen Spenderhornhäute und humanen, kornealen Endothelzellen

Die Fixation des Gewebes ist von wesentlichem Vorteil für die Antigenerfassung und den Erhalt der Gewebestrukturen. Da ein Erhalt der Gewebemorphologie Grundvoraussetzung für histologische Betrachtungen ist, werden im Folgenden die Gewebevorbehandlungen wie z.B. Fixation, Dehydrierung Infiltration des Einbettungsmediums und Antigenretrieval näher diskutiert.

Die Fixation stabilisiert und schützt das Gewebe vor den Effekten der Dehydration, Infiltration und Einbettung. Weniger stark fixiertes Gewebe kann zu Polymerisationsartefakten führen, die durch Autokatalyse verursacht werden (*Newman und Hobot 1987*).

Um die Gewebegängigkeit für den ersten Antikörper und somit die Signalstärke zu erhöhen, wurde in unserer Versuchsanordnung das Gewebe und die Antikörperverdünnung (Antibody-Diluent) mit einer 1 % Triton-Lösung, welches für die Verringerung der Oberflächenspannung verantwortlich war, vorbehandelt. Eine Vorbehandlung des Gewebes mit 1 % Triton und eine zusätzliche

Diskussion

Verdünnung der Antikörper mit 1 % Triton-Lösung erhöhten die Signalstärke und die Intensität der Immunhistochemie.

Die Gewebeproben wurden mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Die Zellkulturen wurden mit Ethanol 70 % in 50 mM Glycinpuffer (pH 2) fixiert. In den technischen Anweisungen des Herstellers, Polysciences Inc., wird für die Gewebefixierung 3-4 % Paraformaldehyd empfohlen (*Technical Data Sheet 305A; Polysciences, Inc.*). Die Fixierung mit Paraformaldehyd führte bei den humanen, kornealen Endothelzellen zu starken Quervernetzungen, wodurch eine Immunhistochemie erschwert wurde. Auf Grund der beschriebenen Quervernetzungen wurden die humanen, kornealen Endothelzellen mit 70 % Ethanol in 50mM Glyzinpuffer (pH2) für 30 Minuten bei -20 °C fixiert. Zugleich war die Art der Fixierung mit 70 % Ethanol in 50 mM Glyzinpuffer weniger Zeit aufwendig und ermöglichte eine zufrieden stellende Immunhistochemie. Erfolgt die Fixierung in Formalin, werden häufig dreidimensionale Komplexe, Proteinstrukturen und DNA-Sequenzen irreversibel zerstört. Durch diese Art der Fixierung reduziert sich die Empfindlichkeit der Analyse-Methoden. Daher kam eine Formalinfixierung für unser Gewebe nicht in Frage.

Aldehyd und Osmium fixierte Gewebe, bei Raumtemperatur, erlaubt keine ausreichende Immunhistochemie (*Hobot und Newman 1991*). Eine minimale Fixierung ist somit notwendig um Proteinextraktionen und Konformationsänderungen des Gewebes zu vermeiden (*Hobot und Newman 1991*). Entgegen der Empfehlung des Herstellers (*Technical Data Sheet 305A; Polysciences, Inc*), fixierten *Hobot und Newman (1991)* ihre Gewebeproben mit Glutaraldehyd. Die Gewebeproben die in Glutaraldehyd-Formaldehyd Gemischen fixiert sind weisen, laut Angaben des Herstellers Polysciences, helle bis fleckige Färbungen bei Lichtmikroskopie und schlechte Strukturen bei Elektronenmikroskopie auf. Hohe Konzentrationen, größer 1 %, wurden für die Markierung von Primärstrukturen verwendet, während niedrigere Konzentrationen von Glutaraldehyd zwar das Gewebe stabilisieren, es aber anfälliger für Schädigungen und Konformationsänderungen machen. Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse wurde eine Glutaraldehydfixierung nicht durchgeführt.

Viele Autoren stellen die Fixationszeit in Zusammenhang mit der Antigenität. Eine geringere Fixationszeit, führt zu geringeren Quervernetzungen, und erhöht somit die Antigenität (*Hayat 1986; Al-Hazzaa und Bowen 1998; Newman und Hobot 1999*). Einen besseren Erhalt der Strukturen des Gewebes, z.B. durch eine längere Fixationsdauer, impliziert nicht automatisch einen besseren Erhalt der Antigenität (*Newman 1987*). Die Ergebnisse der Versuche zeigten, dass eine längere Fixationsdauer zu einer stärkeren Quervernetzung des Gewebes führte. Die erhöhte Quervernetzung der zu untersuchenden Strukturen führte zu einer verminderten Immunhistochemie.

5.2.2. Dehydrierung

Der Dehydrierungsvorgang entzieht dem Gewebe Wasser und erhöht die Gängigkeit des Gewebes für L.R.-White. Die Verwendung von organischen Lösungsmitteln beeinflusst nicht nur die Gewebemorphologie, sondern auch die Antigenität (*Newman und Hobot 1999*). Ethanol hat einen Einfluss auf das Antigen und die Ultrastrukturen. 70 % Ethanol führt zu Schrumpfung und Größenveränderungen des Gewebes (*Boyde et al., 1977*) und/oder zu Lipid-Extraktionen (*Weibull et al., 1983*). Es gilt, unnötig hohe Konzentrationen von Ethanol zu vermeiden, um die bestmögliche Reaktion des Gewebes und deren Antikörpern zu erreichen (*Newman 1987*). Die von diversen Autoren beschriebenen Schrumpfung (*Newman 1987; Boyde et al., 1977*) versuchte Gocht (1992) mit 20 % Polyvinylpyrrolidone in Ethanol gelöst zu kompensieren. Die Anwendung von Polyvinylpyrrolidone führte zu keinem besseren Ergebnis (*Gocht 1992*).

Im Bezug auf den Dehydrierungsvorgang wird zwischen einer vollständigen und einer teilweisen Dehydration unterschieden. Eine vollständige Dehydration, bis zu einer Ethanolkonzentration von 100%, ist lediglich bei Glutaraldehyd fixiertem Gewebe zu empfehlen. Die teilweise Dehydration erfolgt mit Ethanol bis zu einer Konzentration von 70 % und ist empfehlenswert bei schwach fixiertem Gewebe (*Newman und Hobot 1999*). In unserer Versuchsdurchführung fand die

vollständige Dehydration des Gewebes bis zu 100 % Ethanol Anwendung. Das Gewebe war durchgängig gut erhalten. Es wurden keine Extraktionen beobachtet. Autoren wie *Carlemalm et al. (1982)* und *Hobot (1989 und 1991)* gehen noch einen Schritt weiter. Sie dehydrieren vollständig das Gewebe bei niedrigen Temperaturen von -35 °C bis -50 °C. Die Progressive Lowering of Temperature technique (PLT), eine von *Kellenberger et al. (1980)* wieder belebte Methode, erlaubt es, minimal fixiertes Gewebe, welches eine erhöhte Immunreaktivität besitzt, zu untersuchen. Das Prinzip dieser Methode ist die Verwendung einer steigenden Konzentration von organischen Lösungsmitteln während der Dehydrationsphase des Gewebes bei niedrigen Temperaturen. Auf Grund der niedrigen Temperaturen wird die Gewebestruktur geschützt (*Newman und Hobot 1999*). Die Permittivität, die dielektrische Leitfähigkeit, wird reduziert, dadurch ist das Gewebe weniger anfällig für Extraktionen und Konformationsänderungen der Proteinstruktur. Die PLT-Technik erhöht den Erhalt der Gewebestruktur. Die von *Kellenberger et al. (1980)* proklamierte PLT-Methode fand in dieser Arbeit keine Anwendung. In der Versuchsanordnung dieser Arbeit wurde das Gewebe mit 70 % und abs. Alkohol, bei Raumtemperatur, dehydriert. Da das Korneagewebe sehr reichhaltig an Wasser ist wurde das Gewebe zusätzlich mit Chloroform dehydriert um dem Gewebe möglichst viel Wasser zu entziehen.

5.2.3. Infiltration

Die Infiltrationszeit gilt als wichtiger Parameter für die Kunststoffeinbettung und der Gewebemorphologie. L.R.-White hat eine extrem niedrige Viskosität, was uns kürzere Infiltrationszeiten mit L.R.-White erlaubt (Polysciences Inc). In der Versuchsanordnung wurde, wie auch bei anderen Autoren, die Infiltrationszeit, variiert. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Infiltrationszeit keinen Einfluss auf eine bessere Gewebemorphologie hatte (*Gocht 1992*). Vielmehr ist der Einfluss des Kunststoffes auf das Gewebe von besonderer Bedeutung. *Newman und Hobot (1987)* gehen davon aus, dass die Zeit, in der das Gewebe dem Plastik-Monomer ausgesetzt ist, von Bedeutung ist. Sie sind der Meinung, dass der Plastik-Monomer, genauso wie Ethanol, zu plötzlichen Schrumpfungen und Lipid-

Extraktionen, führen kann (Newman und Hobot 1987, Skepper 2000; Sakai et al., 2005). Um das Herauslösen und die Schrumpfungen zu vermeiden, empfehlen Newman und Hobot einen Zwischenschritt (L.R.-White in 70% Ethanol gelöst), bevor das Gewebe in 100% L.R.-White inkubiert wird. In unserer Versuchsanordnung spielten die Art der Dehydration und die Infiltration, sowie deren Nebenwirkungen auf die Gewebestruktur und Antigenität, eine untergeordnete Rolle. Es zeigte sich, dass eine ausreichende Dehydration und Infiltration des Gewebes notwendig war.

5.2.4. Antigen-Retrieval

Antigen-Retrieval ermöglicht die Demaskierung von Antigenen, die durch Fixation, Lagerung und Prozessierung maskiert wurden. Im Vergleich zwischen L.R.-White und Epon eingebetteten Geweben zeigen die in L.R.-White eingebetteten Proben einen höheren Antikörpernachweis (Newman 1989; Wilson et al. 1996; Brorson 1998). Schnitte von in L.R.-White eingebetteten Geweben benötigen keine Antigen-Retrieval Techniken (Newman et al. 1983). L.R. White, so schreiben Kellenberger et al. (1987), umschließt das Gewebe und verursacht keine Quervernetzung, die mittels Antigen-Retrieval aufgebrochen werden könnten. Das in unseren Versuchen verwendete Antigen-Retrieval war eine Pronase Lösung der Firma BioPrime. Die Verwendung der Pronase führte zu keiner erhöhten Antikörpermarkierung, bzw. besseren Färbung des Gewebes.

5.3. Vergleich der verschiedenen Kunststofftypen

Im Bezug auf den Kunststofftyp zeigten alle in L.R.-White Acrylic Resins (weich) eingebetteten Gewebe, Faltungen auf. Die Gewebefalten bezogen sich ausschließlich auf das Gewebe und waren nicht im Kunststoff selbst zu erkennen. Das Endothel und Epithel war nicht abgelöst. Das einschichtige Endothel lag der Descemet-Membran stets durchgehend, gut abgrenzbar von der Descemet-Membran, auf. Eine mögliche Ursache für die Gewebefaltungen könnte das

Aufziehen des Gewebes auf den Objektträger sein. Möglicherweise ist der weiche Kunststofftyp zu weich und eine Versteifung des Gewebes findet nicht statt.

5.4. Polymerisation

5.4.1. Polymerisationsarten

Die Polymerisationsarten sind im Zusammenhang mit der Immunhistochemie und der Gewebemorphologie von Bedeutung. Die verschiedenen Polymerisationsarten sind: die wärme induzierte Polymerisation (Heißpolymerisation), die katalytisch induzierte Polymerisation (Kaltpolymerisation) und die UV-Licht induzierte Polymerisation, welche aus technischen Gründen bei unseren Versuchen nicht berücksichtigt wurde.

Nicht nur wir, sondern auch andere Autoren, beobachteten eine unvollständige Polymerisation des Kunststoffes in den Gelatine kapseln am distalen Ende der Gewebeproben (*Wynford-Thomas et al., 1986; Newman and Hobot 1987; Singharo et al., 1990; Gocht 1992*). Eine mögliche Ursache für die unvollständige Polymerisation ist die unvollständige Sauerstoffinhibition. Ein kompletter Ausschluss von Sauerstoff während der Polymerisation konnte in unserer Versuchsanordnung nicht gewährleistet werden. Bei der Wärme induzierten Polymerisation soll der Kontakt mit Sauerstoff auf ein absolutes Minimum begrenzt werden, weil Sauerstoff für eine ungleichmäßige Polymerisation verantwortlich ist und zugleich sich Schwierigkeiten bei der Schnittherstellung ableiten (*Hirst 1991*).

Die Autoren *Palmieri und Kiss (2005)* befüllten den Polymerisationsofen mit Stickstoff, konnten eine unvollständige Polymerisation dadurch aber nicht vermeiden. Selbst das Erzeugen eines Vakuums brachte keine besseren Polymerisationsergebnisse. Das Vakuum verursachte einen gegenteiligen Effekt, die Blöcke waren spröde und hatten Spannungsbrüche (*Palmieri und Kiss 2005*). *Gocht (1992)* beschrieben die Unterschiede der einzelnen Polymerisationsformen. Im Zusammenhang mit UV-Licht beschreiben *Gocht (1992)* einen besseren Gewebeerhalt als bei der wärme und katalytisch

Diskussion

induzierten Polymerisation. Unsere Beobachtungen, dass L.R.-White eingebettetes Gewebe einer hohen Veränderlichkeit in der Gewebemorphologie und Schnittherstellung unterliegt, werden auch von *Gocht (1992)* beschrieben. *Gocht* bevorzugten die UV-Licht Polymerisation und beschrieben Sprödigkeit, Schrumpfungen und Risse bei den anderen zwei Polymerisationsformen. Neben *Gocht (1992)* beschrieben auch andere Autoren, wie z.B. *Philimonenko et al. (2002)* die UV-Licht induzierte Polymerisation. Im Vergleich mit der Wärme induzierten Polymerisation ermöglicht die UV Licht induzierte Polymerisation spezifischere und intensivere immunhistochemische Färbungen (*Philimonenko et al. 2002*).

Bei unseren Versuchen zeigte die wärme induzierte Polymerisation ebenfalls eine gewisse Sprödigkeit und eine Art Intransparenz. Im Gegensatz zu *Gocht (1992)* war bei der katalytisch induzierten Polymerisation keine Sprödigkeit erkennbar. Die katalytisch induzierten Polymerisationen zeichneten sich, anders als bei *Gocht (1992)*, durch eine gute Transparenz aus. Die von diversen Autoren beschriebenen Gewebeschrumpfungen waren besonders bei den Endothelzellen deutlich.

Die Sprödigkeit der in L.R.-White eingebetteten Gewebe, stellt *Spurr (1969)* in Zusammenhang mit einer unzureichenden Temperaturkontrolle der Polymerisationsöfen.

Die einzelnen Gewebeschnitte unterschieden sich von einander. Es waren Unterschiede bei der Polymerisationsform und bei dem verwendeten Kunststofftyp erkennbar. Die Artefaktneigung war bei den katalytisch (kalt) polymerisierten Geweben vermindert. Der Kunststoff war klarer und transparenter. Er war hier nicht rissig oder spröde. Die Kombination, katalytische Polymerisation und L.R.-White Acrylic Resin, wies einen erhöhten, dunklen Kontrast auf.

Egal welche Methode verwendet wird, ein Kompromiss zwischen Antigenität, Gewebemorphologie und der Einbettungsmethode ist unausweichlich (*Kann und Fouquet 1989*).

5.4.2. Polymerisationstemperatur

Neben der Polymerisationsform spielt die Temperatur bei der Polymerisation eine wichtige Rolle. Newman beschreibt in seinem „Letter to the editor“, (1987) dass eine Temperatur von 50 °C in der Regel eine größere Sensitivität der Antikörper verursacht. Eine Temperatur von 60 °C sollte dabei nicht überschritten werden, da dies zu erheblichen Polymerisationsartefakten führt. Daher sollte schwach und kurz fixiertes Gewebe, um gravierende Polymerisationsartefakte zu vermeiden, bei 0 °C autokatalysiert werden (Newman 1987).

Newman beschreibt, dass gerade der Wechsel mit L.R.-White von Raumtemperatur zur Polymerisationstemperatur von 50 °C zu erheblichen Proteinextraktionen führen kann. Gerade die Wärme induzierte Polymerisation verursacht Proteinextraktionen und ist für eine verminderte Immunhistochemie verantwortlich (Hobot und Newman 1991). Bei unseren Versuchen wurde die wärme induzierte Polymerisation bei genau 60 °C durchgeführt. Eine niedrigere Temperatur führte zu einer unvollständigen Polymerisation, bzw. zu einer unzureichenden Festigkeit des Kunststoffes. Eine Temperatur, die höher lag als 60 °C, führte in unserer Versuchsdurchführung zu Rissen und Sprüngen des Kunststoffes.

Eine Polymerisationstemperatur von 50-60 °C führte, im Zusammenhang mit unseren Gewebeproben, zu einer Eigenfluoreszenz der Zellen.

Die Temperaturerhöhung hat möglicherweise zur Folge das intrazelluläre Prozesse ablaufen und z. B. Enzyme aktiviert werden, die sonst bei Raumtemperatur nicht aktiv sind. Das Ergebnis führte dazu, dass im Zusammenhang mit der Wärme induzierten Polymerisation und fluorochrom-markierten Antikörpern das Verfahren, aufgrund der resultierenden Eigenfluoreszenz und der sich daraus ableitenden Unspezifität, keine Anwendung fand. Eine Eigenfluoreszenz, bei der so genannten Kaltpolymerisation, wurde nicht beobachtet. Bei Verwendung von chromogenen Färbelösungen, wie z.B. 3,3'Diaminobenzidin (DAB), ist die Anwendung der Wärme induzierten Polymerisation möglich, da eine Eigenfluoreszenz der Endothelzellen bei dieser Anwendung nicht berücksichtigt werden muss.

Die Reaktionsgeschwindigkeit der exothermen katalytisch-induzierten Polymerisation kann durch einfaches, gekühltes polymerisieren, in einem Kühltank, bei 4°C, vermindert werden. Während der Zugabe des Accelerators zum L.R.-White sollte ein vorsichtiges Durchmischen erfolgen, damit es zu einer gleichmäßigen Verteilung des Accelerators kommt und eine Blasenbildung verhindert wird (Hobot und Newman 1991).

Eine Eigenfluoreszenz der Endothelzellen wird durch den Kühlvorgang und der katalytisch-induzierten Polymerisation verhindert.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Polymerisation abhängig ist, von der Art des Gewebes, der Vorbehandlung des Gewebes, der Temperatur, der Wahl des Einbettungsmediums und der Polymerisationsform (*Philimonenko et al. 2002*).

5.5. Diskussion der Ergebnisse

5.5.1. Fluorochrom-markierte Antikörper

Der immunhistochemische Nachweis von zellulären Strukturen und Bestandteilen bei kornealen Endothelzellen war mit fluorochrom-markierten Antikörpern sowie mit der LSAB-Methode in Verbindung mit chromogenen Farbstoffe möglich. Der Nachweis von bekannten zellulären Strukturen mit den Antikörpern anti-CD-29 und Ki-67 wurde erbracht. Die fluorochrom-markierten Antikörper FITC, Alexa 488 und Alexa555 waren ebenfalls kunststoffstabil und wurden weder durch L.R.-White noch durch den Polymerisationsvorgang beeinflusst. Die Möglichkeit von so genannten Doppelfärbungen mittels fluoreszierender Antikörper war möglich. Die Signalstärke der Immunhistochemie ist jedoch abhängig von den zu untersuchenden Epitopen. Die anschließende Kunststoffeinfettung der humanen kornealen Endothelzellen beeinflusst den Kontrast der immunhistochemischen Färbung.

5.5.2. Chromogene Färbelösungen: 3,3-Diaminobenzidin (DAB)

Der Farbstoff 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) erwies sich als besonders brauchbar für L.R.-White Schnitte (Newman 1987; Newman und Hobot 1987; Singhrao et al., 1990; AL-Hazza und Bowen 1998). 3,3'-Diaminobenzidin erwies sich auch in unseren Versuchen als kunststoffstabil und ermöglichte gute Färbungen und wurde während des Polymerisationsvorganges nicht verändert oder beeinträchtigt. 3,3'-Diaminobenzidin gehört zu den gängigsten Farbstoffen in der Licht- und Elektronenmikroskopie (Newman and Hobot 1987). Bei Verwendung von nicht-fluorochrom-markierten Antikörpern, d.h. bei Verwendung von chromogenen Färbelösungen, wie z.B. 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), ist die Anwendung der Wärme induzierten Polymerisation möglich, da eine Eigenfluoreszenz der Endothelzellen bei dieser Anwendung nicht berücksichtigt werden muss.

5.5.3. Chromogene Färbelösungen: Permanent-Red (P-Red)

Der Farbstoff Liquid Permanent Red der Firma Dako führte zu keinen guten Ergebnissen in Zusammenhang mit einer Einbettung in L.R.-White. Die immunhistochemische Färbung war vor der Kunststoffeinbettung gut erkennbar, jedoch nach erfolgter Kunststoffeinbettung, verschwunden. Die Ursache liegt in der Unverträglichkeit mit Alkohol, bzw. anderen organischen Lösungsmitteln, was zu einer Entfärbung, bzw. Beeinträchtigung der Färbung führen kann. Der Hersteller Dako warnt vor einem Gebrauch von Alkohol und Xylol vor der permanenten Fixierung, weil diese Reagenzien zu nachteiligen Folgen für die Färbung führen können. Die Kunststoffeinbettung, genauer gesagt die Konservierung des Gewebes mittels Acrylaten, ist der permanenten Fixierung gleichzusetzen und setzt einen Dehydrierungsschritt mit Hilfe von organischen Lösungsmitteln voraus. Der Dehydrierungsschritt gilt als wesentlicher Bestandteil des Verfahrens

und ist obligat für die Einbettung des Gewebes. Das variieren mit den Alkoholreihen führte jedoch zu keinen besseren Ergebnissen. Das Liquid Permanent Red war nicht nachweisbar in Kunststoffschnitten.

5.6. Paraffin vs. Kunststoffeingebetteten Spenderhornhäuten

Paraffin eingebettete Strukturen ermöglichen eine gute Immunhistochemie und es sind nahezu alle Antikörper anwendbar, im Gegensatz dazu steht die verminderte Gewebestruktur des Endothels und der Descemet-Membran. Die Möglichkeit des Antigen-Retrievals, bei Paraffin eingebetteten Gewebeproben, erhöhen die Antigenität und somit das Ergebnis der Immunhistologie. Eine Immunhistochemie ist auch nach der Einbettung in Paraffin möglich.

Die Kunststoffeingebetteten Gewebe besitzen eine bessere Gewebestruktur. Die zu untersuchenden Strukturen, wie Endothel und Descemet-Membran konnten mit den L.R.-White Schnitten gut dargestellt werden. Der Antikörpernachweis von zellulären Strukturen am Endothel und der Descemet-Membran war im Vergleich zu den Paraffin eingebetteten Geweben erschwert.

Die Antigenität der in Kunststoff eingebetteten Spenderhornhäute ist von mehreren Faktoren abhängig. Es ist bekannt das nicht alle Antikörper, die eine Immunreaktivität in Paraffinschnitten verursachten auch eine Immunreaktivität in L.R.-White Schnitten erzeugen (*Gocht 1992*). Vielmehr müssen dann Alternativen, wie z.B. Immunhistochemie an Cryoschnitten, angewendet werden. Ein wesentlicher Vorteil des L.R.-White gegenüber dem Paraffin ist, neben der Lichtmikroskopie, die Möglichkeit der Elektronenmikroskopie. Dieser wesentliche Vorteil, ermöglicht ein breiteres Analysespektrum.

Gerade die fragilen und sich leicht ablösenden Endothelzellschicht und Descemet-Membran, die schwer zu untersuchen und darzustellen sind, lassen sich mit L.R.-White gut betrachten und analysieren. Die Zahl der verwendbaren Antikörper ist nicht ausreichend determiniert (*Polyscience Inc.*). Die zahlreichen Faktoren, von denen das Ergebnis der Immunhistochemie abhängt, müssen berücksichtigt und in Einklang gebracht werden. In der Regel muss ein

Diskussion

Kompromiss zwischen Antigenität und Gewebemorphologie getroffen werden. Egal welche Methode verwendet wird, sei es die Einbettung in Paraffin, Epoxid oder mit Methacrylaten, ein Kompromiss zwischen Antigenität, Gewebemorphologie und der Einbettungsmethode ist unausweichlich (*Kann und Fouquet 1989*).

6. Zusammenfassung

Das korneale Gewebe ist auf Grund der beschriebenen Eigenschaften ein schwer zu untersuchendes Gewebe. Die einzelnen Gewebeschichten der Kornea lösen sich schnell von einander ab, wodurch die histologische Betrachtung und Untersuchung des Gewebes erschwert wird. Immunhistochemische Färbemethoden im Zusammenhang mit der Paraffineinbettung waren in der Vergangenheit möglich, eine differenzierte Betrachtung und Untersuchung der einzelnen Korneaschichten, wie z.B. Endothelschicht und Descemet-Membran, jedoch erschwert.

Der hydrophile und niedrig visköse Acrylkunststoff L.R.-White, der in der Licht- und Elektronenmikroskopie Anwendung findet, ermöglicht eine differenzierte Betrachtung und Untersuchung des kornealen Gewebes. Die Anwendung des Acrylkunststoffes setzte ein optimiertes Protokoll voraus. Die zu untersuchenden Strukturen, Descemet-Membran und Endothel, waren gut abgrenzbar und die verwendeten Antikörper (anti-CD-29 und Ki67) konnten in genveränderten, kornealen Endothelzellen und zum Teil in humanen Spenderhornhäuten nachgewiesen werden. Der chromogene Farbstoff 3,3`Diaminobenzidin (DAB) erwies sich, im Gegensatz zu Liquid Permanent-Red, als anwendbar. Auf Grund der beobachteten Eigenfluoreszenz von Endothelzellen bei 60°C sind die fluorochrom-markierten Antikörper (Fitc, Alex 488, 546 und 555) lediglich im Zusammenhang mit der katalytisch induzierten Polymerisation anwendbar.

Wesentliche Unterschiede in Bezug auf Polymerisationsart und Kunststofftyp waren nicht erkennbar. Die Artefaktneigung war bei den katalytisch (kalt) polymerisierten Geweben vermindert. Der Kunststoff war wesentlich klarer und transparenter. Er wirkte hier nicht rissig oder spröde. Lediglich die Kombination, katalytische Polymerisation und L.R.-White Acrylic Resin, wiesen einen erhöhten, dunklen Kontrast auf

Den Untersuchungen nach gibt es sieben wesentliche Faktoren, die einen Einfluss auf die Antigenität und das Ergebnis der immunhistochemischen Färbung haben. Auf der einen Seite sind die Fixierung des kornealen Gewebes, der Dehydrationsvorgang des Gewebes mit der graduierten Ethanolreihe und die

Zusammenfassung

Infiltration des Gewebes mit dem Plastikmonomer zu nennen. Auf der anderen Seite stehen das Polymerisationsverfahren, die verwendeten Antikörper, der für die Färbung verwendete Farbstoff und die zu untersuchenden Zielstrukturen (Epitope). Es ist daher von extremer Wichtigkeit alle genannten Faktoren in Einklang zu bringen um ein bestmögliches Ergebnis zu gewährleisten.

Fazit:

Die Kunststoffpolymerisation unter Verwendung von L.R.-White stellt eine Alternative bei immunhistologischen Untersuchungen dar. Gerade bei schwierig zu untersuchenden Geweben, wie es bei kornealem Gewebe der Fall ist, bei denen für die immunhistologische Untersuchung eine gute Gewebemorphologie Voraussetzung ist, stellt L.R.-White eine Alternative dar. Das in dieser Arbeit erarbeitete Protokoll ist optimiert für die in dieser Arbeit verwendeten Gewebe. Das Gewebe und der verwendete Kunststoff, sowie die verwendeten Antikörper setzen ein spezifisches und etabliertes Protokoll voraus. Auf Grund der Eigenfluoreszenz von kornealen Endothelzellen, setzt die Verwendung von fluorochrom-markierten Antikörpern die katalytisch induzierte Polymerisation voraus. Bei der Anwendung von chromogenen Färbelösungen sind verschiedene Polymerisationsformen möglich.

7. Literaturverzeichnis

Al-Hazzaa AA, Bowen ID (1998) Improved cytochemical methods for demonstratin cell death using LR White as an embedding medium. The Histochemical Journal 30: 897-902

Bednarz J, Teifel M, Friedl P, Engelmann K (2000) Immortalization of human corneal endothelial cells using electroporation protocol optimized for human corneal endothelial and human retinal pigment epithelial cells. Acta Ophthalmol Scand.;78: 130-136.

Bucher O, Wartenberg H (1997) Das Sehorgan. Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, 12. vollständig überarbeitete Auflage; Verlag Hans Huber Bern – Göttingen - Toronto – Seattle, 453ff

Brakebusch C , Fässler R (2005) β 1 integrin function in vivo: Adhesion, migration and more. Cancer and Metastasis Reviews 24: 403–411

Brorson SH, Skjrten F (1994) Antibody Penetration into LR-White Sections. Micron, Vol 25: 453-460

Brorson SH (1998) The combination of high-accelerator epox resin and antigen retrieval to obtain more intense immunolabeling on epoxy sections than on LR White sections for large Proteins. Micron, Vol 29: 89-95

Boenisch T (2003) Handbuch Immunchemische Färbemethoden. DakoCytomation 3. Auflage

Bourne WM, Kaufman HE (1976) The endothelium of clear corneal transplants. Arch Ophthalmol 94: 1730-1732

Literaturverzeichnis

Boyde A, Bailey E, Jones SJ, Tamarin A (1977) Dimensional changes during specimen preparation for SEM. SEM/IITri 1, 507-508

Carlemalm E, Garavito RM, Villiger W (1982) Resin development for Electron Microscopy and an analysis of embedding at low temperature. J Microsc (Oxford) 126: 123-143

Cursiefen C, Kruse FE (2008) Posteriore lamelläre Keratoplastik (DSAEK). Der Ophthalmologe 105: 183–192

Davson, H (1972) The Physiology of the Eye, 68-85, Academic Press, New York

DakoCytomation Product Sheet, Dako LSAB+ Kit, Peroxidase Universal K0679 Instructions

Ebihara N, Mizushima H, Miyazaki K, Watanabe Y, Ikawa S, Nakayasu K, Kanai A (2000) The functions of exogenous and endogenous laminin-5 on corneal epithelial cells. Exp Eye Res 71: 69-79

Engelmann K, Bednarz J, Böhnke M (1999) Endothelzelltransplantation und Wachstumsverhalten des humanen kornealen Endothels. Der Ophthalmologe 96: 555-562

Fromm M, Hegel U, Wiederholt M, Hierholzer K (1991) Pathophysiologie des Menschen. Weinheim: Chapman & Hall

Geroski DH, Matsuda M, Yee RW, Edelhauser HF (1985) Pump function of the human corneal endothelium. Ophthalmology 92: 759-763

Grehn F (1998) Physiologie. Augenheilkunde , 27. überarbeitet und aktualisierte Auflage; Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

Literaturverzeichnis

Grehn F und Leydecker W (1995) Augenheilkunde. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg

Gocht A (1992) Use of LR White Resin for Post-Embedding Immunolabelling of Brain Tissue. Acta Anat 145: 327-339

Hayat MA (1986) Glutaraldehyde: role in electron microscopy. Micron Microsc Acta 17: 5-135

Hirst EMA (1991) An Easy Method for orientated embedding Tissue Culture Cell Monolayers in LR White Resin for postembedding Immunocytochemistry. Journal of Electron Microscopy Technique 17: 456-458

Hobot JA (1989) The Lowicryls and low temperature embedding for colloidal gold methods. In : Hayat MA, ed. Colloidal Gold: Principles, Method and Applications. San Diego: Academic Press, 75-115

Hobot JA (1991) Low temperature embedding techniques for studying microbial cell surfaces. In: Mozes N, Handley P, Busscher HJ, Rouxhet PG, eds. Microbial Cell Surface Analysis: Structural and PhysicoChemical Methods. New York: VCH Publishers,. 127-150

Hobot JA, Newman GR (1991) Strategies for Improving the cytochemical and immunocytochemical sensitivity of ultrastructurally well-preserved, Resin embedded biological tissue for light and electron microscopy. Scanning Microscopy Supplement 5: 27-41

Huppelsberg J, Walter K (2003) Der dioptrische Apparat. Kurzlehrbuch Physiologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart

Jakus MA (1956) Studies on the Cornea. II The Fine Structure of Descemet's Membrane. J Biophysic Biochem Cytol .2: 243-252

Literaturverzeichnis

Junqueira LC, Carneiro J (1991) Histologie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
Kann ML, Fouquet JP (1989) Comparison of LR White resin, Lowicryl K4M and Epon postembedding procedures for immunogold staining of actin in the testis. Histochemistry 91: 21-226

Kapoor R, Sakai L, Funk S, Roux E (1988) Type VIII collagen has a restricted distribution in specialized extracellular matrices. J Cell Biol 107: 721-730

Kellenberger E, Carlemalm E, Villiger W, Roth J, Garavito RM (1980): Low Denaturarion Embedding for Electron Microscopy of Thin Sections. Waldkraiburg, Germany: chemische Werke Löwi GmbH

Kellenberger E, Durrenberger M, Villiger W, Carlemalm E, Wurtz M (1987) The effieency of immunolabel on Lowicryl sections compared to theoretical predictions. J Histochem Cytochem 35: 959-969

Kriegelstein GK, Jonescu-Cuypers CP, Severin M(1999) Funktionelle Anatomie und Untersuchungsmethoden. Atlas der Augenheilkunde ; Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York: 68 ff

Laing RA, Neubauer L, Oak S, Leibowitz HN (1984) Evidence for mitosis in the adult corneal endothelium. Ophthalmology 91: 1129-1134.

Lang GK (1998). Augenheilkunde-verstehen-lernen-anwenden. Stuttgart, New York; Thieme Verlag

Leber Th (1873) Studien über den Flüssigkeitswechsel im Auge. A v Graefes Arch Klin Exp Opthal 19: 87-95

Levy S, Moss J, Sawada H, Dopping-Hepenstal P, McCartney A (1996) The composition of wide-spaced collagen in normal and diseased descemet's membrane. Curr Eye Res. 1996 15: 45-52

Literaturverzeichnis

Lopez JG, Hagenah M, Insler MS (1989) Growth factors and corneal endothelial wound healing. Beuerman R.W., Crosson C.E. und Kaufman H.E. (Hrsg.) Healing processes in the cornea: 139-150

Matsuda M, Ubels JL, Edelhauser HF (1986) Corneal endothelial healing rate and the effect of topical retinoic acid. Invest Ophthalmol Vis Sci 27: 1193-1198.

Maurice DM (1957) The structure and transparency of the cornea. J Physiol (Lond.) 136: 263-286

Maurice DM (1968) Cellular Membrane activities in the corneal endothelium of the intact eye. Experientia 24: 1094- 1095

Maurice DM, Riley MW (1970) The Biochemistry of the Eye. (Graymore, C. N., ed.): 1-103, Academic Press, New York

Melles GRJ, Kamminga N (2003) Techniken der posterioren lamellären Keratoplastik über einen skleralen Zugang. Der Ophthalmologe 100: 689–695

Meyer, L.; Bednarz, J.; Mueller-Goymann, C.C.; Reichl S. (2005) Esteraseaktivität eines organotypischen humanen Cornea-Konstrukts (HCC) als in-vitro Modell für Permeationsuntersuchungen. Der Ophthalmologe 102: 971-980

Mishima S, Hayakawa M (1972) The function of the corneal endothelium in relation to corneal hydration and nutrition. Is J Med Sc 8: 1507-1518

Nakayasu K, Tanaka M, Konomi H, Hayashi T (1986) Distribution of types I, II, III, IV, and V collagen in normal and keratoconus corneas. Ophthalmol Res 18: 1-10

Newman GR, Jasani B, Williams ED (1983) A simple post-embedding system for the rapid demonstration of tissue antigens under the electron microscope. The Histochemical Journal 15: 543-555

Literaturverzeichnis

Newman GR (1987) Letter to the editor: Use and abuse of LR White. The Histochemical Journal 19: 118-120

Newman GR (1989) LR White embedding medium for colloidal gold methods: In Hayat MA, ed. Colloidal Gold Principles, Methods and Applications. Vol2. San Diego, Academic Press: 47-73

Newman GR, Hobot JA (1987) Modern acrylics for post-embedding immunostaining techniques. J Histochem Cytochem 35: 971-981

Newman GR, Hobot JA (1999) Resins for combined light and electron microscopy: A half century of development. The Histochemical Journal 31: 495-505

Newsome DA, Groos J, Hassel JR (1982) Human corneal stroma contains three distinct collagens. Invest Ophthalmol Vis Sci 22: 376-381

Nishiuchi R, Murayama O, Fujiwara H, Gu J, Kawakami T, Aimoto S, Wada Y und Sekiguchi K (2003) Characterization of the Ligand-Binding Specificities of Integrin $\alpha 3\beta 1$ and $\alpha 6\beta 1$ Using a Panel of Purified Laminin Isoforms Containing Distinct α Chains. J. Biochem, 2003, Vol. 134, No. 4: 497-504

Palmieri M, Kiss JZ (2005) A novel technique for flat-embedding cryofixed plant specimens in LR White Resin. Microscopy research and technique 68: 80-84

Philimonenko VV, Janáček J, Hozák P (2002) LR White is preferable to Unicryl for immunogold detection of fixation sensitive nuclear antigens. European Journal of Histochemistry 46: 359-364

Polysciences, Inc. Technical Data Sheet 305A; L.R.-White Resin Catalog Number 17411-500 Accelerator for L.R.White Catalog Number 17413-10

Literaturverzeichnis

Reichl, S.; Bednarz, J.; Müller-Goymann, C.C. (2004) Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. Br. J. Ophthalmol. 88: 560-565

Reichl, S.; Döhring, S.; Bednarz, J.; Mueller-Goymann, C.C. (2005) Human cornea construct HCC - an alternative for in-vitro permeation studies? A comparison with human donor corneas. Eur. J. Pharm. Biopharm. 60: 305-308

Reim M (1985) Hornhaut und Bindehaut. Biochemie des Auges: 13-46

Sakai Y, Hosaka M, Hira Y, Watanabe T (2005) Addition of phosphotungstic acid to ethanol for dehydration improves both the ultrastructure and antigenicity of pituitary tissue embedded in LR White acrylic resin. Arch Histol Cytol 68: 337-347

Singhrao S, Cole G, Henderson WJ, Newman GR (1990) LR White embedding allows a multi-method approach to the analysis of brain tissue from patients with Alzheimer's disease. The Histochemical Journal 22: 257-268

Skepper JN (2000) Immunocytochemical strategies for electron microscopy: choice or compromise. J Microsc 199: 1-36

Stur M, Grabner G. (1983) The corneal endothelium – morphology, function and clinical importance. Wien klin Wochenschr 95: 274-276

Spurr AR (1969) A low viscosity resin embedding medium for electron microscopy. J Ultrastruct Res 26: 31-43

Taylor M.J. (1986) Clinical cryobiology of tissue preservation of corneas. Cryobiology 23: 323-353

Literaturverzeichnis

Vrana, N.E.; Builles, N.; Justin, V.; Bednarz, J.; Pellegrini, G.; Ferrari, B.; Damour, O.; Hulmes, D.J.S.; Hasirci V. (2008) Development of a Reconstructed Cornea from Collagen–Chondroitin Sulfate Foams and Human Cell Cultures. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.* 49: 5325-5331

Waring GO, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR (1982) The corneal endothelium: normal and pathologic structure and function. *Ophthalmol* 89: 531-590

Weibull C, Christiansson A, Carlemalm E (1983) Extraction of membrane lipids during fixation, dehydration and embedding of *Acholeplasma Laidlawii* – cells for electron microscopy. *J Microsc* 129: 201-207

Wilson DF, Jian DJ, Pierce AM, Wiebkin OW (1996) Antigen retrieval for electron microscopy using a microwave technique for epithelial and basal antigens. *Appl Immunohistochem* 4: 66-71

Wolf E. (1951) *The Anatomy of the Eye and Orbit*. New York; The Blakiston Co

Wynford-Thomas D, Jasani B, Newman GR (1986) Immunohistochemical localization of cell surface receptors using a novel method permitting simple, rapid and reliable LM/Em correlation. *The Histochemical Journal* 18: 387-396

Yue BYJT, Baum JL (1976) The synthesis of glycosaminoglycans by cultures of rabbit corneal endothelial and stromal cells. *Biochem J* 158: 567-574

Zorn-Kruppa, M.; Tykhonova, S.; Belge, G.; Bednarz, J.; Diehl, H.A.; Engelke, M. (2005) A human cornea equivalent constructed from SV40-immortalized corneal cell lines. *ATLA (Alternatives To Laboratory Animals)* 33: 37-45

Danksagung

8. Danksagung:

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. G. Richard für die Aufgabenstellungen der vorliegenden Arbeit.

Ferner danke ich Herrn Dr. rer. nat. Jürgen Bednarz, Herrn Dr. med. Asbed Aintablian und Frau Altenähr für die Betreuung und für die hilfreichen Anregungen. Ein besonderer Dank geht an Dr. Kais Al-Samir für die hilfreiche und freundliche Unterstützung.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Hornhautbank und des histologischen Labors, für ihre wertvollen Ratschläge und praktischen Hilfeleistungen.

Ganz besonderer Dank gilt auch meiner Familie. Sie hat mein Leben geebnet, gesichert, mich immer tatkräftig unterstützt und an mich und meine Ziele geglaubt.

9. Lebenslauf / Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Vor- und Zuname: Andreas Wolfram Benecke
Geburtstag: 22.07.1979
Geburtsort: Halle/Saale
Wohnort: 20255 Hamburg, Schwenckestr. 102
Telefon: 040-23811106 & 0176-70059105
E-Mail: Benecke@dentios.com
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

09/1992 - 07/1996 Otto- Hahn- Gymnasium in Göttingen
Abschluss: Sekundarabschluss I
08/1996 - 07/1997 Tara High School in Baton Rouge, Louisiana,
USA Abschluss: Recognition of Straight A'
Honorstudent
09/1997 - 07/1999 Otto- Hahn- Gymnasium in Göttingen
Abschluss: Erweiterter Sekundarabschluss II

Ersatzdienst:

09/1999 - 12/2000 Diakonisches Werk Chrsitophorus in
Göttingen

Studium:

04/2001 - 12/2006 Studium der Zahnmedizin an der Universität
Hamburg in Hamburg
Abschluss: Staatsexamen
01/2005 – heute Doktorand
05/2007 – heute Zahnarzt in der Klinik und Poliklinik für Zahnärztliche
Prothetik an der Universität Hamburg Eppendorf

Erklärung

10. Erklärung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich diese Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

(Unterschrift)