

Aus der Augenklinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Der Einfluss der Stimulation von Adreno- und Muskarinrezeptoren auf die
Wundheilung des kornealen Epithels

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Maximilian Bernhard Rink
Lahnstein

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 31.07.2024

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung / Ziel der Dissertation	1
1.1.	Hintergrund.....	1
1.2.	Zielsetzung	3
2.	Literaturdiskussion.....	4
2.1.	Anatomie und Physiologie der menschlichen Kornea	4
2.2.	Phenylephrin und Noradrenalin: grundlegende Wirkmechanismen und ihre Bedeutung in Humanmedizin und Augenheilkunde	7
2.3.	Carbachol: grundlegender Wirkmechanismus und Bedeutung in Humanmedizin und Augenheilkunde.....	8
2.4.	Das autonome Nervensystem	8
2.5.	Adrenerge und muskarinerge Rezeptoren am kornealen Epithel: Stand der Forschung	10
2.5.1.	Die verschiedenen adrenergen Rezeptoren.....	10
2.5.2.	Effekte adrenerger Stimulation im kornealen Epithel	14
2.5.3.	Muskarinerge Acetylcholinrezeptoren	15
2.5.4.	Effekte cholinergischer Stimulation im kornealen Epithel	16
2.6.	Zusammenfassung	18
3.	Material und Methoden	18
3.1.	Materialien	18
3.1.1.	Geräte	18
3.1.2.	Software	19
3.1.3.	Chemikalien.....	19
3.1.4.	Verbrauchsmaterial	21
3.1.5.	Zelllinie	22
3.2.	Methoden.....	22
3.2.1.	Zellkulturen.....	22
3.2.2.	Literatursuche.....	24

3.2.3.	Proliferationsassays	24
3.2.4.	Migrationsassays.....	26
3.2.5.	MTS-Assays	27
3.2.6.	Statistische Auswertung	29
4.	Ergebnisse	29
4.1.	Proliferation und Migration.....	29
4.1.1.	Einfluss von Noradrenalin auf die Proliferation kornealer Epithelzellen 29	
4.1.2.	Einfluss von Phenylephrin und Carbachol auf die Proliferation kornealer Epithelzellen	32
4.1.3.	Einfluss von Noradrenalin auf die Migration kornealer Epithelzellen ...	34
4.1.4.	Einfluss von Phenylephrin und Carbachol auf die Migration kornealer Epithelzellen	37
4.2.	MTS	39
5.	Diskussion	43
5.1.	Methodische Einschränkungen	43
5.2.	Effekte adrenerger Stimulation	45
5.3.	Effekte cholinerges Stimulation.....	48
5.4.	Ausblick	51
6.	Zusammenfassung	52
7.	Literaturverzeichnis.....	55

Abkürzungsverzeichnis

ANS	autonomes Nervensystem
AMWF	Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften e.V.
BRD	Bundesrepublik Deutschland
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOG	Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft
DPBS	Dulbecco´s phosphate-buffered saline
FKS	fetales Kälberserum
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
ICD	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme
IP ₃	Inositoltrisphosphat
mAChR	muskarinerge Acetylcholinrezeptoren
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NAD(P)H	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NK	neurotrophe Keratopathie
oct	optische Kohärenztomographie
PenStrep	Penicillin-Streptomycin
PZN	Pharmazentralnummer
rpm	Umdrehungen pro Minute

RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SPSS	IBM SPSS Statistics (Software)
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
μ l	Mikroliter

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Stimulationsschema A.....	25
Tabelle 2: Stimulationsschema B.....	25
Tabelle 3: Stimulationsgruppen MTS.....	28
Tabelle 4: Ergebnisse Migrationsassay Noradrenalin, Vergleich der beiden Gruppen mit Ascorbinsäure.	36
Tabelle 5: Ergebnisse Migrationsassay Noradrenalin, Vergleich zu den Kontrollgruppen.....	36
Tabelle 6: Ergebnisse Migrationsassay Phenylephrin und Carbachol.....	39
Abbildung 1: schematischer Schnitt durch die Kornea.	5
Abbildung 2: Überblick über die adrenergen Rezeptoren.....	14
Abbildung 3: Beispielbild des künstlichen Spaltes im Migrationsassay:	27
Abbildung 4: Umsetzung von MTS zu Formazan	28
Abbildung 5: Einfluss von Noradrenalin und Ascorbinsäure auf die Proliferation.....	31
Abbildung 6: Einfluss von Phenylephrin und Carbachol auf die Proliferation.	33
Abbildung 7: Einfluss von Noradrenalin auf die Migration.	35
Abbildung 8: Beispiel zum Spaltverschluss im Migrationsassay.....	37
Abbildung 9: Einfluss von Phenylephrin und Carbachol auf die Migration.....	38
Abbildung 10: Einfluss einer adrenergen sowie cholinergen Stimulation auf die Absorption.....	42

1. Einleitung / Ziel der Dissertation

1.1. Hintergrund

Die transparente, aus mehreren Schichten bestehende, gekrümmte Hornhaut (lat. Kornea) stellt die vorderste Begrenzung des menschlichen Auges dar. Sie erfüllt mehrere Funktionen, die für ein optimales Sehen elementar sind.

Mit einer Brechkraft von insgesamt +43 Dioptrien, bei einem Brechungsindex von 1,376 (1), spielt sie die Hauptrolle bei der Brechung des einfallenden Lichtes und ist somit essenziell zur korrekten Bildfokussierung. Zusätzlich erfüllt sie für die übrigen Strukturen des Auges eine wichtige mechanische Schutzfunktion. Kommt es zu strukturellen Schäden ist die Ausübung dieser Funktionen beeinträchtigt. Solche Schäden können beispielsweise im Rahmen traumatischer Verletzungen (z.B. durch die Äste eines Baumes), infektiöser Prozesse oder durch den Kontakt mit schädlichen Fremdmaterialien (Säuren und Laugen) entstehen. Gerade Verätzungen durch Laugen sind gefährlich, da Laugen in tiefere Schichten eindringen und diese schädigen können (2).

Verletzungen der Kornea spielen nicht nur in der Augenheilkunde selbst, sondern auch in der allgemeinen klinischen Notfallmedizin eine wichtige Rolle. So stellten sich in den USA im Jahr 2008 über 600.000 Patienten mit Problemen des Auges in den Notaufnahmen vor (3). Verletzungen der Kornea stellen die häufigsten notfallmäßigen Diagnosen in diesem Zusammenhang dar (4). Meistens handelt es sich hierbei um zwar schmerzhaft, jedoch oberflächliche Verletzungen, die bei adäquater Therapie in der Regel komplikationslos abheilen. Bei tiefergehenden Schädigungen, insbesondere in Kombination mit die Wundheilung verzögernden Faktoren, kann es jedoch auch zu Problemen bei der Heilung kommen. Bei Verzögerungen der Heilung des Defektes, können stärkere Schäden, beispielsweise ein *Ulcus corneae* oder eine Perforation der Hornhaut entstehen, die eine Therapieeskalation notwendig machen und zu weiteren Komplikationen oder dauerhaften Schäden führen können.

Vor diesem Hintergrund ist es entscheidend, nicht nur Ursachen kornealer Verletzungen zu kennen, sondern auch Risikofaktoren für eine reduzierte Heilung zu identifizieren sowie effektive Therapieoptionen zu entwickeln. Einen volkswirtschaftlich besonders bedeutenden Risikofaktor für schlecht heilende Epitheldefekte der Kornea stellt der Diabetes mellitus (DM) dar. Die enorme sozialmedizinische Bedeutung dieses Krankheitsbildes veranschaulicht ein Blick in Zahlen des statistischen

Bundesamtes. Im Jahr 2015 wurden durch das Krankheitsbild des DM (ICD10-E10-E14) in der BRD Krankheitskosten von über vier Milliarden Euro verursacht (5). Eine durch das RKI erhobene Umfrage aus den Jahren 2014/2015 gibt für den DM innerhalb der erwachsenen Bevölkerung der BRD eine 12-Monats-Prävalenz von 7,7% an (bei Ausschluss eines reinen Schwangerschaftsdiabetes) (6). In der gleichen Erhebung zeigte sich auch eine deutliche Zunahme der Prävalenz mit steigendem Alter. Betrachtet man die Todesursachenstatistik für das Jahr 2016 findet sich der DM in der BRD bei einer fünfstelligen Anzahl an Menschen (5). Die klassische Komplikation eines DM am Auge stellt die diabetische Retinopathie, als häufige Erblindungsursache, dar. Jedoch sollte die Häufigkeit von diabetesbedingten Veränderungen im Bereich der Kornea nicht unterschätzt werden. Sie treten wohl bei knapp 50-70% der Patienten auf (7) und stellen somit keine seltene Komplikation dar. Es kommt zu einer progredienten Schädigung der kornealen Nerven und entsprechend zur Entwicklung von Symptomen. Diese reichen von anfänglich trockenen Augen und einem Fremdkörpergefühl bis hin zu nicht heilenden Epithelschäden oder kornealen Ulzerationen. Man spricht bei klinischer Manifestation auch vom Krankheitsbild der diabetischen Keratopathie, eine durch den DM verursachte Form der neurotrophen Keratopathie (NK).

Für die NK existiert eine von Dua et. al 2018 vorgeschlagene (8) und 2019 ins Deutsche übersetzte Definition (9): „Die Neurotrophe Keratopathie ist eine Erkrankung, die mit Veränderungen der Hornhautnerven einhergeht und dadurch zu einer Beeinträchtigung der sensorischen und trophischen Funktion mit konsekutivem Zusammenbruch des Hornhautepithels führt und so die Gesundheit und Integrität des Tränenfilms, des Epithels und des Stromas beeinträchtigt.“ Es lassen sich, abhängig von der Beteiligung der kornealen Schichten, drei Stadien differenzieren. Während sich bei milden Formen zwar bereits Veränderungen, jedoch noch keine Defekte des Epithels zeigen, ist Letzteres bei den moderaten Formen bereits der Fall. In schweren Fällen kommt es auch zu einer Beteiligung des Stromas. Obligat ist das Vorliegen einer Hornhauthypästhesie (8, 9).

Eine NK kann auch durch eine Vielzahl an anderen Ursachen entstehen, beispielsweise durch Herpesviren oder im Rahmen eines traumatischen Geschehens. Zahlen aus Italien gehen, abhängig vom Ausmaß der Schädigung, von bis zu 11.478 Euro Behandlungskosten pro Jahr und Patient beim Vorliegen einer NK aus (10). Die Bedeutung der Erkrankung wird auch in aktuellen Übersichtsartikeln und Fallserien

beschrieben (11-13). In Kombination mit den oben genannten Zahlen ergibt sich neben der medizinischen auch eine gesundheitsökonomisch hohe Relevanz für ein besseres Verständnis sowie neue Therapieansätze der kornealen Wundheilung.

In der klinischen Praxis existieren verschiedene medikamentöse und operative Ansätze zur Verbesserung der Wundheilung des kornealen Epithels unabhängig von der Ursache der Heilungsverzögerung. Medikamentöse Ansätze liegen unter anderem in der topischen Applikation von Tränenersatzmitteln, Vitamin A oder verschiedenen Wachstumsfaktoren (14) .

Für durch konservative Therapie nicht beherrschbare Defekte des Epithels existiert zum Beispiel das Verfahren der Amnionmembrantransplantation. Bei der reifen Plazenta bilden Amnionepithel und Amnionbindegewebe die innerste Schicht. Diese kann während eines Kaiserschnittes (bei vorherigem Ausschluss entsprechender Kontraindikationen wie einer HIV-Infektion) gewonnen und kryokonserviert werden. Nach erfolgreicher Transplantation kommt es zur Förderung der Reepithelialisierung und Hemmung der Narbenbildung (14, 15).

1.2. Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit setzt an der medikamentösen Beeinflussbarkeit der Wundheilung des kornealen Epithels an. Es wird die Hypothese geprüft, dass korneale Epithelzellen *in vitro* in ihrem Proliferations- und Migrationsverhalten durch die Stimulation von Rezeptoren des autonomen Nervensystems beeinflusst werden können. Beide Prozesse spielen eine wichtige Rolle für eine funktionierende Wundheilung. Es wurden verschiedene Arten von Assays zur Untersuchung von Proliferations- sowie Migrationsverhalten durchgeführt.

Stimuliert wurde mit Phenylephrin (α_1 -Agonist), Carbachol (Agonist cholinergischer Rezeptoren) und Noradrenalin (Agonist für α -Adrenozeptoren und β -Adrenozeptoren). Die Existenz entsprechender Rezeptoren am Epithel der Kornea wurde in der Vergangenheit bereits nachgewiesen (16-20). Die Datenlage bezüglich des Einflusses einer solchen Stimulation auf die korneale Wundheilung ist nach aktuellem Stand jedoch sowohl für die adrenergen (21-26) als auch die muskarinergischen Rezeptoren (27-31) noch widersprüchlich.

2. Literaturdiskussion

2.1. Anatomie und Physiologie der menschlichen Kornea

Die menschliche Kornea stellt die vorderste Begrenzung des Auges dar. Die im physiologischen Zustand transparente Kornea lässt sich histologisch noch einmal in fünf beziehungsweise sechs Schichten unterteilen. Diese sind von innen nach außen: Endothel, Descemet-Membran, Stroma, Bowman-Membran und Epithel. Beim Endothel handelt es sich um eine einzige Zellschicht, deren Aufgabe unter anderem im Abtransport von Wasser aus dem Stroma liegt und die weniger als einen Prozent des Gesamtvolumens der Kornea ausmacht (1). Gehen Zellen des Endothels zugrunde, ist nach heutigem Wissensstand eine Neuentstehung nicht möglich. Mittelfristig führt ein fortschreitender Abfall der Endothelfunktion zu stromalen Flüssigkeitseinlagerungen und zu einer Eintrübung der Kornea und somit zur Beeinträchtigung des Sehens. Um eine ausreichende Flüssigkeitshomöostase zu gewährleisten, wird im Endothel eine Zelldichte von 300-800 Zellen/mm² benötigt (1). Die Descemet-Membran trennt Endothel und Stroma voneinander. Die dickste Schicht der Kornea ist das Stroma, eine zellarme, etwa 400-500 µm dicke, in der Hauptsache aus kollagenem Bindegewebe bestehende Schicht, die beim Menschen ungefähr 85% des gesamten Volumens der Kornea ausmacht (1). Ein physiologischer Zustand des Stromas ist für die Transparenz der Kornea unabdingbar. Zwischen Stroma und Epithel befindet sich die azelluläre Bowman-Membran. (2, 32)

Neben diesen bekannten fünf Schichten wurde durch eine englische Arbeitsgruppe im Jahr 2013 aufgrund experimenteller *ex vivo* Ergebnisse die Existenz einer weiteren, zwischen Stroma und Descemet-Membran gelegenen Schicht postuliert (33). Im weiteren Verlauf erfolgte auch die Veröffentlichung klinischer Hinweise (34). Diese, als Dua-Membran bezeichnete, Schicht hebt sich unter anderem durch ihre Azellularität vom restlichen Stroma ab. Ob es sich hierbei jedoch tatsächlich um eine eigene korneale Schicht handelt, oder lediglich um einen Teil des Stromagewebes, ist umstritten (34-36).

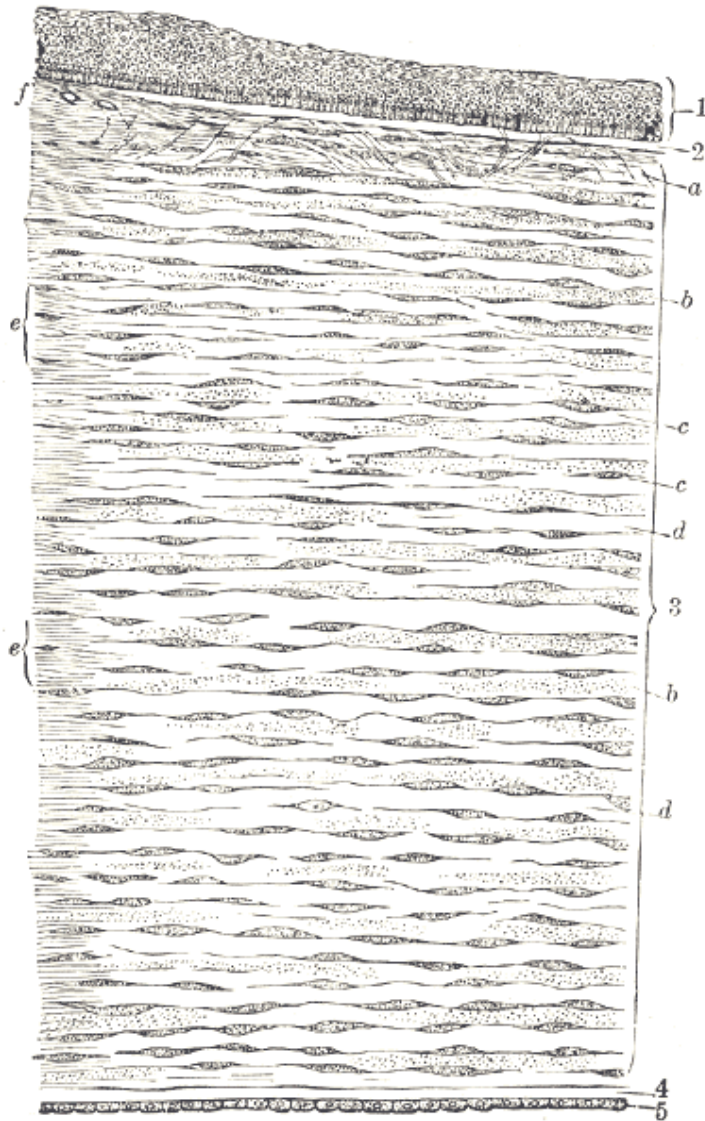


Abbildung 1: schematischer Schnitt durch die Kornea. Gezeigt sind die im Text genannten Schichten der Kornea. 1: Epithel; 2: Bowman-Membran (Lamina limitans anterior) 3: Stroma; 4: Descemet-Membran (Lamina limitans posterior) 5: Endothel. Quelle: Henry Gray, Anatomy of the human body 20.Auflage, 1918 (37)

Das korneale Epithel stellt ein aus mehreren Zellschichten bestehendes, unverhorntes Plattenepithel dar, welches unter physiologischen Bedingungen durch den Tränenfilm bedeckt wird (2, 32). Es macht etwa 10% des Gesamtvolumens der Kornea aus (1). Betrachtet man die Struktur des Epithels bildgebend mit OCT, so zeigt sich eine Dicke von etwa 50 bis 55 Mikrometern, bei fünf bis sechs morphologisch trennbaren Zellschichten (38). Das Epithel weist, im Unterschied zum Endothel, eine ausgeprägte Fähigkeit zur Regeneration auf, die auch ohne besondere Verletzung der Kornea kontinuierlich erfolgt. Der genaue Ablauf ist sehr komplex. In Grundzügen läuft er unter physiologischen Bedingungen folgendermaßen ab: Die basale Zellschicht des Epithels enthält teilungsfähige Zellen die an der Oberfläche des Epithels zugrunde gehende

Zellen ersetzen können. Dieser Prozess läuft beim Gesunden kontinuierlich ab. Hierfür notwendige Stammzellen finden sich im Bereich des Limbus (2). Hierbei handelt es sich um eine funktionell spezialisierte Zone zwischen Kornea, Sklera und Konjunktiva. Der Regenerationsprozess erfolgt entsprechend von der Peripherie zum Zentrum durch eine langsame Migration und begleitende Proliferation dieser Zellen (39, 40). Stehen die beiden fördernden Prozesse mit dem stetigen Verlust von oberflächlichen Epithelzellen im Gleichgewicht so bleibt die Zahl kornealer Epithelzellen konstant. Dieser Zusammenhang wurde bereits 1983 als „X,Y,Z Hypothese“ publiziert (41). Inwiefern sich dieser Prozess bei ausgedehnteren Defekten verändern kann und welchen Kontrollmechanismen er unterliegt, war zum damaligen Zeitpunkt weitestgehend unklar.

Kommt es zu einer Schädigung des kornealen Epithels lässt sich die Heilung des Defektes in zwei Phasen unterteilen: Eine erste Phase, in der es zu einer verstärkten Migration von Zellen aus dem Randbereich der Wunde, ohne eine Größenabnahme der Läsion kommt und eine zweite, die den Verschluss des Defektes und die Wiederherstellung physiologischer Verhältnisse zum Ziel hat. Hierzu werden verschiedene Prozesse, wie Migration- und Proliferation, unter anderem der Stammzellen im Bereich des Limbus, gesteigert (42, 43). Steigerung von Migration und Proliferation ergänzen sich dabei zwar in ihrer Funktion, laufen jedoch grundsätzlich unabhängig voneinander ab. Ein dritter wichtiger Prozess ist die Adhäsion der neuen Epithelzellen am umgebenden Gewebe. Dieser Prozess schließt die Wundheilung ab (43). Ein alternativer Weg besteht in der Heilung kornealer Wunden ausgehend vom Epithel der Konjunktiva. Dieser Weg wird in Fällen wichtig, in denen der Limbus ebenfalls geschädigt ist (43). Ist das Limbusepithel intakt und funktioniert regelgerecht, verhindert es die Migration von Zellen des Epithels der Konjunktiva in den Bereich der Kornea (44).

Der Vorgang der epithelialen Wundheilung unterliegt einer Vielzahl an Einflussfaktoren. Experimentelle Hinweise für eine Beeinflussung existieren beispielsweise für Melatonin (45), rekombinant hergestelltes Gelsolin (46) oder auch Ascorbinsäure (47-49). Neben den erwähnten Faktoren spielt offenbar auch das Tabakrauchen eine Rolle, welches die Wundheilung zu verzögern scheint (50), ebenso wie der im Rahmen der Einleitung bereits thematisierte Diabetes mellitus.

Neben den in der Einleitung bereits erwähnten Therapieverfahren aus der klinischen Praxis, befinden sich eine Reihe verschiedener Therapieansätze zur Verbesserung

der Wundheilung im Epithel der Kornea in Erforschung, etwa die gezielte Gentherapie mittels viraler Vektoren (51, 52) oder die Verwendung von Nanotechnologie (53). Auch die erwähnten Stammzellen im Bereich des Limbus (44, 54-56) sowie naturheilkundliche Ansätze (57) sind Gegenstand aktueller Forschung.

Die Kornea ist aufgrund ihrer hohen Brechkraft ein essentieller Bestandteil zur Gewährleistung einer guten optischen Funktionalität des menschlichen Auges. Sie fungiert dabei als Sammellinse, das heißt sie bündelt einfallendes Licht. Weiterhin erfüllt die Kornea eine Schutzfunktion gegenüber den übrigen Strukturen des Auges, indem sie beispielsweise ein Eindringen von potenziellen Krankheitserregern mechanisch verhindert. Die Kornea ist nicht vaskularisiert, jedoch durch trigeminale Äste sensibel und zusätzlich autonom innerviert und deutlich schmerzempfindlich. Die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen funktioniert durch Diffusion (2, 32).

2.2. Phenylephrin und Noradrenalin: grundlegende Wirkmechanismen und ihre Bedeutung in Humanmedizin und Augenheilkunde

Bei Phenylephrin handelt es sich um einen Agonist an adrenergen Rezeptoren, mit bevorzugter Bindung an α_1 -Adrenozeptoren (58). Am Auge wird hierdurch durch Kontraktion des Musculus dilatator pupillae eine Mydriasis erreicht. Auf dem Markt existieren Augentropfen, die Phenylephrin enthalten und beispielsweise für eine gewünschte iatrogene Mydriasis genutzt werden, bei Bedarf in Kombination mit einem Parasympatholytikum (die Substanzen setzen dann an verschiedenen inneren Augenmuskeln an). Bezüglich potentieller systemischer Veränderungen von Herzfrequenz und Blutdruck kam eine 2015 durchgeführte Metaanalyse zu dem Ergebnis, dass Augentropfen mit niedriger Konzentration von Phenylephrin beides nicht relevant beeinflussen. Bei höheren Konzentrationen scheint es zwar zu geringfügigen Änderungen zu kommen, diese sind jedoch auch ohne Intervention schnell rückläufig (59). Unter Beachtung einiger Kontraindikationen, wie zum Beispiel dem Engwinkelglaukom, können die entsprechenden Tropfen daher im klinischen Alltag weitgehend sicher verabreicht werden. Auch außerhalb der Augenheilkunde findet Phenylephrin Anwendung in der Humanmedizin. Nach aktuellen Leitlinien kann es beispielsweise gegeben werden, wenn es im Rahmen eines Kaiserschnitts in rückenmarknaher Regionalanästhesie zur Hypotension bei der werdenden Mutter kommt (60).

Auch Noradrenalin zeigt eine agonistische Wirkung an Adrenozeptoren. Es findet sich im menschlichen Körper unter anderem als Neurotransmitter. Dabei wird es in den entsprechenden Nerven selbst, ausgehend von Tyrosin, erzeugt (61). Im Unterschied zum Phenylephrin bindet Noradrenalin jedoch auch gut an β_1 -Adrenozeptoren (62). Praktische Anwendung findet Noradrenalin hauptsächlich in der Herz-Kreislauf-Medizin, beispielsweise ist es nach aktuellen Leitlinien der Vasopressor der Wahl beim infarktbedingten kardiogenen Schock (63). In der Augenheilkunde findet Noradrenalin in der klinischen Praxis keine Verwendung.

2.3. Carbachol: grundlegender Wirkmechanismus und Bedeutung in Humanmedizin und Augenheilkunde

Bei Carbachol handelt es sich um einen Agonisten an cholinergen Rezeptoren, mit einer im Vergleich zum Acetylcholin längeren Halbwertszeit. In dieser Gruppe unterscheiden wir muskarinerge von nikotinerge Rezeptoren. Carbachol bindet an Rezeptoren beider Gruppen und wirkt parasymphomimetisch (64). Die Bindung an die muskarinerge Rezeptoren erfolgt bei Carbachol Subtyp-unabhängig (65). Am Auge kommt es zu einer Senkung des Augeninnendrucks und begleitender Miosis. Gerade Ersteres lässt sich therapeutisch nutzen. So stellen Carbachol enthaltende Augentropfen beispielsweise eine Therapiealternative in der Behandlung des chronischen Offenwinkelglaukoms dar (64). In der Gruppe der cholinerg wirkenden Augentropfen wird Pilocarpin jedoch am häufigsten verschrieben (66). Außerhalb der Augenheilkunde spielt Carbachol in der Humanmedizin eine geringe Rolle. Indiziert ist es beispielsweise zur Behandlung von Miktionsstörungen als Folge einer antipsychotischen Medikation (67).

2.4. Das autonome Nervensystem

Das autonome Nervensystem (ANS) des Menschen entzieht sich weitgehend der bewussten, willkürlichen Kontrolle. Es hat zentrale sowie periphere Anteile und passt die Funktion der menschlichen Organe kontinuierlich an die sich konstant verändernden Umweltbedingungen an. Darüber hinaus erfüllt das ANS homöostatische Funktionen, letztere im Zusammenspiel mit dem endokrinen System. Sein efferenter Anteil lässt sich dabei in zwei Anteile einteilen, den Sympathikus und den Parasympathikus. Nur durch deren Zusammenspiel kann das autonome Nervensystem (Synonym: Vegetatives Nervensystem) zielgerichtet wirken. Verfeinert wird das Zusammenspiel dadurch, dass beide Teilsysteme immer eine gewisse

Grundaktivität aufweisen. Somit ist stets eine Steigerung oder Senkung der jeweiligen Aktivität möglich.

Während der Sympathikus vereinfacht eher zu einer Steigerung der Aktivität führt („fight or flight“), kommt es durch parasympathischen Einfluss in vielen Fällen zu einer Minderung der Aktivität („rest and digest“). Eine wichtige Rolle zur Übermittlung dieser Signale spielen cholinerge sowie adrenerge Rezeptoren. Die Afferenzen des ANS weisen diese Zweiteilung in sympathisches und parasympathisches System nicht auf. Einen eigenständigen Anteil des ANS stellt das enterische Nervensystem dar, auf dessen Bedeutung hier nicht weiter eingegangen werden soll.

Efferenzen des ANS bestehen in beiden Teilsystemen aus zwei hintereinander geschalteten Neuronen. Die Umschaltung vom ersten auf das zweite Neuron erfolgt im Bereich der vegetativen Ganglien. Diese liegen für den Sympathikus meistens im parallel zum Rückenmark verlaufenden *Truncus sympathicus*, für den Parasympathikus im Bereich der Erfolgsorgane selbst. Der Neurotransmitter beider Systeme ist an dieser Stelle Acetylcholin und es werden nikotinische cholinerge Rezeptoren genutzt. Das zweite Neuron vermittelt seine Wirkung am entsprechenden Erfolgsorgan über adrenerge (Sympathikus; Neurotransmitter ist Noradrenalin) beziehungsweise muskarinerge (Parasympathikus; Neurotransmitter bleibt Acetylcholin) Rezeptoren. Eine Ausnahme stellt die sympathische Innervation der Schweißdrüsen dar, die ebenfalls durch Acetylcholin erfolgt (68). Je nach der genauen Zusammensetzung der Rezeptoren am Erfolgsorgan unterscheidet sich die jeweilige Wirkung. So kommt es an glatter Muskulatur durch α -Rezeptoren zu einer Kontraktion, durch β -Rezeptoren jedoch zum Gegenteil.

Die autonome Innervation der Kornea war und ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Die sympathische Innervation unterscheidet sich in ihrer Quantität deutlich zwischen verschiedenen Säugetierarten, wobei sie beim Menschen zwar vorhanden, jedoch nicht besonders ausgeprägt zu sein scheint (69-74). Klinische Hinweise auf eine sympathische Innervation der Kornea beim Menschen liefern beispielsweise Untersuchungen von Patienten mit einem einseitigen Horner-Syndrom. Bei diesem Krankheitsbild kommt es zu einem Ausfall der unter anderem für den Bereich des Auges zuständigen sympathischen Innervation. Die klassische Trias besteht aus Miosis, Ptosis und Enophthalmus. An der Kornea betroffener Patienten wurden unter anderem eine erhöhte Dicke des Epithels sowie verstärkte Reaktionen (beispielsweise Ödeme) auf gegen die Kornea gerichteten hypoxischen Stress

beobachtet (75). Beides weist auf eine zumindest gering vorhandene sympathische Innervation der menschlichen Kornea hin.

Eine parasymphatische Innervation der Kornea wurde unter anderem in Mäusen und Ratten nachgewiesen. Ob die menschliche Kornea eine solche Innervation ebenfalls aufweist ist bis heute jedoch unklar (26, 73, 74, 76).

Grundsätzlich ist bekannt, dass das autonome Nervensystem die Wundheilung beeinflussen kann. Beispielsweise zeigen Ratten mit Brandwunden eine beschleunigte Heilung nach Denervierung sympathischer Nervenfasern (77) und Manipulationen am ANS der Maus beeinflussen die korneale Wundheilung (26). Die Wundheilung ist also offenbar durch das ANS modulierbar.

Auf die weiteren anatomischen und physiologischen Aspekte des autonomen Nervensystems, wie beispielsweise den Einfluss übergeordneter Steuerzentren, soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter eingegangen werden.

2.5. Adrenerge und muskarinerge Rezeptoren am kornealen Epithel: Stand der Forschung

2.5.1. Die verschiedenen adrenergen Rezeptoren

Bereits seit 1948 ist bekannt, dass es verschiedene Formen der adrenergen Rezeptoren - genannt α - und β -Adrenozeptoren - gibt (78), die unterschiedliche Prozesse in Gang setzen, verschiedene physiologische Aufgaben erfüllen und sich nicht, wie vorher postuliert, streng in „exzitatorische Rezeptoren“ und „inhibitorische Rezeptoren“ trennen lassen. So konnte beispielsweise schon damals den α -Rezeptoren eine vasokonstriktive, den β -Rezeptoren dagegen eine vasodilatierende Funktion zugeordnet werden (78). Im Laufe der Zeit erfolgte eine genauere Unterteilung der Adrenozeptoren in α_1 -, α_2 -, β_1 -, β_2 - und β_3 -Adrenozeptoren. Alle diese Rezeptoren gehören zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, einer allein beim Menschen über 800 Rezeptoren umfassenden Gruppe (79, 80) mit herausragender Bedeutung für die Humanmedizin. Allein in der Ophthalmologie finden beispielsweise die α_2 -Sympathomimetika Clonidin und Brimonidin oder Betablocker, wie das Timolol (66) breite klinische Anwendung. Auch andere G-Protein gekoppelte Rezeptoren, beispielsweise die Dopamin-Rezeptoren, sind in vielen Fällen (in diesem Beispiel vor allem in den Bereichen der Neurologie und Psychiatrie) die Zielstruktur medikamentöser Behandlungen.

Der prinzipielle Aufbau dieser Rezeptoren ist immer gleich. Vereinfacht gibt es einen extrazellulär gelegenen Anteil mit dem N-terminalen Ende, der für die Bindung entsprechender Liganden zuständig ist. Es folgen sieben, die Zellmembran durchspannende, α -Helices und dann ein intrazellulär gelegener Abschnitt der mit verschiedenen intrazellulären Strukturen (unter anderem dem namensgebenden G-Protein) interagiert und das C-terminale Ende aufweist (79, 80). Über diese Interaktionen können Zellprozesse gesteuert werden. Wichtig zu wissen ist, dass auch von G-Proteinen völlig unabhängige Signalwege existieren. Tatsächlich können durch den gleichen Rezeptor sogar ligandenabhängig verschiedene Signalwege innerhalb der Zelle in Gang gesetzt werden (79, 81).

G-Proteine bestehen aus funktioneller Perspektive grundsätzlich aus einer α -Untereinheit sowie einer dimeren $\beta\gamma$ -Untereinheit. Die α -Untereinheit besitzt eine Bindungsstelle für Nucleotide. Es existieren verschiedene Formen der α -Untereinheit: $G\alpha_s$, $G\alpha_i/G\alpha_0$, $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ und $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$. Je nachdem welche Art G-Protein durch einen Rezeptor aktiviert wird kommt es zu unterschiedlichen zellulären Folgen (79). Auch β - und γ -Untereinheit liegen in verschiedenen Formen vor, die unterschiedlich kombiniert werden können.

Wird ein adrenerger Rezeptor durch die Bindung seines Liganden nun aktiviert, so kommt es zur Bindung des entsprechenden G-Proteins an den Rezeptor. Ein inaktives G-Protein bindet GDP an seiner α -Untereinheit, welches sich durch die Bindung des G-Proteins am Rezeptor löst (79). Bindet das G-Protein nun GTP, löst sich die Bindung zum Rezeptor und es zerfällt in die α - sowie die dimere $\beta\gamma$ - Untereinheit. Intrazelluläre Prozesse können dann durch diese beiden Funktionseinheiten in Gang gesetzt werden. Die α -Untereinheit selbst besitzt die Funktion einer GTPase und kann das gebundene GTP somit zu GDP hydrolysieren (79). Eine wichtige Rolle im Beenden der Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors spielt auch das β -Arrestin. Dieses Protein existiert in mehreren Varianten und ist nicht nur in der Lage den aktivierten Rezeptor zu desensibilisieren, sondern spielt auch (zumindest bei vielen G-Protein gekoppelten Rezeptoren) eine entscheidende Rolle bei deren Endozytose (82). Der Einfluss von β -Arrestin kann bei der Gabe von an G-Protein gekoppelten Rezeptoren agonistischer Medikation auch zum klinischen Bild der Tachyphylaxie als Form der pharmakologischen Toleranzentwicklung führen (79).

Im Bereich der α_1 -Rezeptoren wurden verschiedene Subtypen gefunden, heute kennt man α_{1A} -, α_{1B} - und α_{1D} -Rezeptoren (83) als Subtypen des α_1 -Rezeptors. Beim in der Literatur gelegentlich auftretenden α_{1L} -Rezeptor handelt es sich um eine Variante des α_{1A} -Rezeptors, nicht um einen eigenen Typ (84, 85). Die exakten molekularen Abläufe durch Stimulation der verschiedenen Rezeptoren sind sehr komplex. Alle Subtypen binden im menschlichen Körper Adrenalin sowie Noradrenalin. Bei den α_1 -Rezeptoren handelt es sich um $G_{q/11}$ -Protein gekoppelte Rezeptoren, deren Aktivierung intrazellulär zu einer Erhöhung von Inositoltrisphosphat (IP_3) sowie Diacylglycerin führt. Durch verschiedene Prozesse innerhalb der Zelle kommt es letztlich zur Phosphorylierung verschiedener Proteine und zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Durch eine Stimulation von α_1 -Rezeptoren kann auch die Genexpression eines Gewebes modifiziert werden (86).

Der Nachweis von α_1 -Rezeptoren im menschlichen Korneaepithel gelang 1991(20). Genutzt wurde der Nachweis der Bindung von 3H -Prazosin, einem α_1 -Antagonisten, der sich als Radioligand nutzen lässt. 2006 konnte die Existenz von α_1 -Adrenozeptoren im Korneaepithel durch Nachweis der Bindung entsprechender Antikörper sowie kontrollierende Western Blots bestätigt werden (18). Bezüglich der bekannten Subtypen des α_1 -Rezeptors konnten Musayeva et al. 2018 die Expression aller drei Subtypen im Epithel der Kornea von Mäusen nachweisen, wobei der α_{1A} -Subtyp dominierte (87).

Die zweite große Gruppe adrenerger Rezeptoren stellen die β -Adrenozeptoren dar. Sie lassen sich weiter einteilen in β_1 -, β_2 -, und β_3 -Adrenozeptoren. Beim als eigenen Typ diskutierten „ β_4 -Adrenozeptor“ handelt es sich wohl eher um eine spezielle Form des β_1 -Adrenozeptors (88). Unabhängig vom Subtyp handelt es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren, deren Wirkung „klassischerweise“ über G_s -Proteine vermittelt wird. Ihre Aktivierung führt intrazellulär zu einer Aktivitätserhöhung der Adenylylzyklase mit nachfolgendem Anstieg der cAMP-Konzentration (die Adenylylzyklase setzt ATP zu cAMP und Diphosphat um), einer Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration sowie Steigerung der Aktivität der Proteinkinase A (cAMP abhängig). Die Proteinkinase A kann in der Folge die Aktivität verschiedener intrazellulärer Enzyme durch Phosphorylierung regulieren. Im Laufe der Zeit wurden verschiedene alternative Signalwege gefunden, durch die über β -Adrenozeptoren intrazelluläre Veränderungen hervorgerufen werden können. Beispielsweise wurde

2017 ein von G_{α_s} , G_{α_i} sowie cAMP unabhängiger Mechanismus der Calciummobilisation durch die Stimulation von β_2 -Adrenozeptoren entdeckt, unter Einbezug der Phospholipase C (Enzym, hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat zu IP_3 und Diacylglycerin) sowie des Rezeptors für IP_3 (89). Interessanterweise werden einige, unabhängig von einem G-Protein funktionierende, Signalwege durch eine Interaktion zwischen dem β -Rezeptor und dem bereits erwähnten β -Arrestin vermittelt (90). Diese von β -Arrestin abhängigen Signalwege sind offenbar sogar durch ausgewählte Substanzen aus der Gruppe der „Betablocker“ (definiert aufgrund ihrer antagonistischen Wirkung auf die G-Protein vermittelten Effekte der β -Rezeptoren) wie das Carvedilol auslösbar (91).

Die Existenz von β -Adrenozeptoren im Epithel der Kornea verschiedener Säugetierarten, inklusive des Menschen, wurde durch verschiedene Experimente gezeigt, beispielsweise mit Hilfe radioaktiv markierter Bindungspartner (19, 92, 93). Neuere Experimente bestätigten die Existenz von β_1 - sowie β_2 -Adrenozeptoren im menschlichen kornealen Epithel durch entsprechende Western Blots und immunhistochemische Nachweisverfahren (18).

Neben diesen beiden Formen adrenerger Rezeptoren existieren noch die α_2 -Adrenozeptoren, auch diese in drei Subtypen: α_{2A} , α_{2B} und α_{2C} (81). Hierbei handelt es sich um G_i -Protein gekoppelte Proteine, bestehend aus einer $\alpha_{i/o}$ -Untereinheit sowie einer dimeren $\beta\gamma$ -Untereinheit, die prä- wie postsynaptisch vorkommen. Im autonomen Nervensystem führen sie zu einer Abnahme der Aktivität des Sympathikus. Diese wird vor allen Dingen durch negative Feedbackmechanismen an der Präsynapse erreicht. Hierzu verändert die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit den Ionenstrom in der Präsynapse, wodurch sich das Zellpotential stabilisiert. Intrazellulär wird durch die $G_{\alpha_{i/o}}$ -Untereinheit die Aktivität der Adenylylzyklase gehemmt und die Konzentration an cAMP sinkt (81). Neben diesen, klassischen G_i -Protein vermittelten Effekten, können auch α_2 -Adrenozeptoren weitere, unabhängig funktionierende Signalwege starten. Beispielsweise ist auch durch die Stimulation von α_2 -Adrenozeptoren eine Aktivierung der Phospholipase C mit folgendem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration möglich (94). Die drei Subtypen übernehmen im menschlichen Organismus verschiedene Aufgaben, die Hemmung der Freisetzung von Noradrenalin unterliegt dabei zum Großteil dem Einfluss des α_{2A} -Adrenozeptors, während der α_{2C} -Adrenozeptor für die Kontrolle der Adrenalinfreisetzung im Nebennierenmark wesentlich ist (81).

Eine vereinfachte Übersicht über die adrenergen Rezeptoren liefert nachfolgende Abbildung (95).

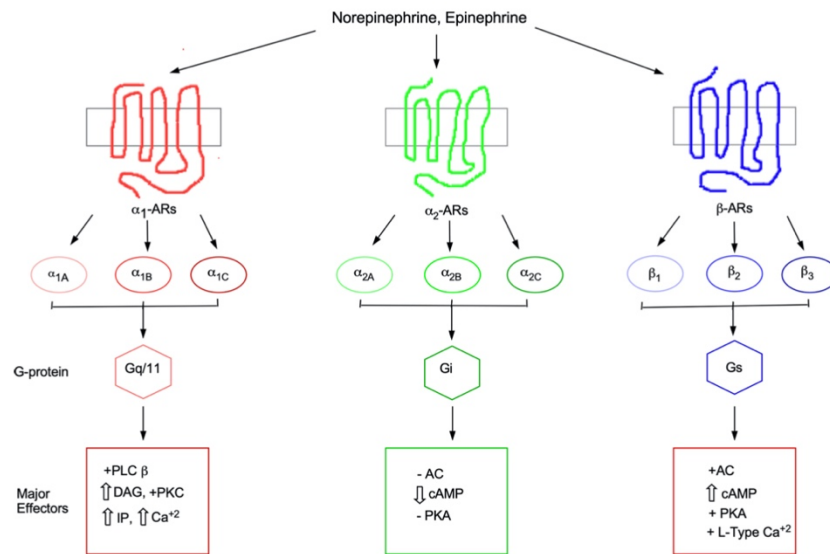


Abbildung 2: Überblick über die adrenergen Rezeptoren. Gezeigt sind die Klassen adrenerger Rezeptoren, ihre Subtypen und wichtige zelluläre Effekte ihrer Aktivierung. AC: Adenylylzyklase, AR: adrenerger Rezeptor, Ca: Kalzium, cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat, DAG: Diacylglycerol, IP: Inositolphosphat, L-Type-Ca: L-Typ Kalziumkanal, PLC: Phospholipase, PKA: Proteinkinase A, PKC: Proteinkinase C (Abbildung aus (95)).

2.5.2. Effekte adrenerger Stimulation im kornealen Epithel

Daten zum Einfluss adrenerger Stimulation auf die Wundheilung des kornealen Epithels sind widersprüchlich. Eine 2007 erschienene Arbeit beschreibt einen hemmenden Einfluss des unselektiven β-Adrenozeptor Agonisten Isoproterenol auf die Wundheilung sowie Migration kornealer Epithelzellen, während der β-Adrenozeptor Antagonist Timolol positive Effekte zeigte (25). Die gleiche Arbeit kam zu dem Ergebnis, dass das Proliferationsverhalten weder durch β-Agonisten noch β-Antagonisten beeinflusst werde (25). Der negative Einfluss einer adrenergen Stimulation auf Migration und Wundheilung wurde an Zellen der Maus bestätigt und gleichzeitig die Abhängigkeit dieser Effekte von einem funktionierenden β₂-Adrenozeptor gezeigt (21). Auch eine 2018 veröffentlichte Arbeit an Mäusen zeigte einen negativen Einfluss einer verstärkten Sympathikusaktivität sowie topischer Applikation von Isoproterenol auf die Wundheilung. Die Effekte ließen sich durch die Applikation von β-Adrenozeptorantagonisten reduzieren (26). Eine weitere 2018 veröffentlichte Arbeit fand keinen Einfluss auf die Proliferation des kornealen Epithels bei Gewebeproben von Mäusen, wenn die Expression eines α₁-Subtyps verhindert wurde (87).

Es existieren jedoch auch Untersuchungen die einen positiven Einfluss adrenerger Stimulation auf die korneale Wundheilung nahelegen. So fanden Murphy et al. bereits 1998 einen positiven Effekt von Noradrenalin auf Migration sowie Proliferation kornealer Epithelzellen (23). Andere Versuche zeigten einen negativen Einfluss von Timolol (β -Adrenozeptor-Antagonist) bei Kaninchen beziehungsweise Affen (24) sowie von mehreren β -Blockern mit höherer Spezifität (22).

Neben diesen auf die Reepithelialisierung bezogenen Daten, wurden weitere Effekte adrenerger Stimuli auf das Korneaepithel untersucht. So zeigt sich bei Mäusen, bei denen die Expression des α_{1A} -Adrenozeptors unterbunden wird, eine geringere Dicke des Epithels sowie eine verminderte Größe einzelner epithelialer Zellen (87).

Experimente mit dem α_2 -Agonisten Clonidin legen nahe, dass eine Stimulation dieser Rezeptoren für Zellen des menschlichen kornealen Epithels sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zytotoxisch ist und proapoptotisch wirkt (96). Da in den Experimenten der vorliegenden Arbeit jedoch nicht mit α_2 -Agonisten gearbeitet wurde, sollen deren Effekte an dieser Stelle nicht weiter besprochen werden. Zytotoxische Effekte ab einer gewissen Konzentration zeigten sich *in vitro* auch für Dipivetrin, sowie (in höheren Dosen) für Timolol. Dipivetrin zeigte darüber hinaus einen schädigenden Effekt gegen die Zellmembran (97).

2.5.3. Muskarinerge Acetylcholinrezeptoren

Die muskarinergen Acetylcholinrezeptoren (mAChR) gehören ebenfalls zur im Vorangegangenen bereits beschriebenen Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Ihr natürlicher Ligand ist das Acetylcholin. Sie sind jedoch ebenfalls durch das namensgebende Muskarin, ein Pilzgift, aktivierbar. Eine weitere durch Acetylcholin aktivierbare Rezeptorgruppe stellen die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren dar. Im Unterschied zu den mAChR handelt es sich bei Letzteren jedoch um ionotrope Rezeptoren, das heißt durch die Bindung des passenden Liganden wird ein Ionenkanal geöffnet (ionotrope Rezeptoren werden daher auch als ligandengesteuerte Ionenkanäle bezeichnet). Da in den in diesem Rahmen durchgeführten Experimenten keine spezifischen Agonisten oder Antagonisten nikotinischer Acetylcholinrezeptoren genutzt wurden, soll auf diese Gruppe im Folgenden nicht weiter eingegangen werden.

Bei den mAChRs lassen sich nach der 1998 veröffentlichten Klassifikation des *International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification* insgesamt fünf Subtypen, M₁, M₂, M₃, M₄, und M₅, identifizieren (65, 98).

Die Subtypen lassen sich bezüglich der G-Proteine mit denen sie interagieren in zwei Gruppen einteilen: Die erste Gruppe besteht aus M₁, M₃ und M₅, die zweite Gruppe aus M₂ und M₄. Rezeptoren der zweiten Gruppe vermitteln einen großen Teil ihrer Wirkung G_i-Protein gekoppelt (16, 98). Wie bereits beschrieben führt dieser Signalweg über eine geringere Aktivität der Adenylylzyklase zu niedrigeren Konzentrationen von cAMP innerhalb der Zelle. Diese Konzentrationsabnahme sowie die folgende Minderung der Aktivität der Proteinkinase A konnten für eine Stimulation des M₄-Rezeptors auch an kornealen Epithelzellen bereits gezeigt werden (99). Auch über andere Wege, beispielsweise G₀-gekoppelt scheinen intrazelluläre Effekte erzielt zu werden (16, 98).

Die andere Gruppe der mAChRs, bestehend aus M₁, M₃ und M₅ vermittelt ihre Effekte vor allem über G_{q/11}-Proteine. Durch diese Proteine kommt es wie bereits beschrieben zur Aktivierung der Phospholipase C (98). Muskarinerge Rezeptoren können darüber hinaus -wie für die adrenergen Rezeptoren bereits beschrieben- auch Effekte über die gekoppelten βγ-Untereinheiten der G-Proteine auslösen.

Auch für die mAChRs war die Frage nach deren Vorkommen im kornealen Epithel von Säugetieren lange umstritten. Beispielsweise gelang in einer 1979 durchgeführten Arbeit der Nachweis dieser Rezeptoren im kornealen Epithel bei Kaninchen nicht (100), während in Arbeiten aus dem Jahr 1991 das Bindungsverhalten spezifischer Radioliganden deutliche Hinweise auf die Existenz von mAChRs in menschlichen kornealen Epithelzellen erbrachte (101). In neueren Untersuchungen an menschlicher Spenderkornea gelang der Nachweis von M₂-, M₄- und M₅- Rezeptoren im Epithel mit Hilfe spezifischer Antikörper sowie Western Blots (16) beziehungsweise in anderen Arbeiten sogar der Nachweis sämtlicher Subtypen (17). In einer Studie aus dem Jahr 2014 wiederum gelang an immortalisierten, kultivierten Zellen des humanen Epithels der Kornea durch eine RT-PCR der mRNA in Kombination mit einem Western Blot lediglich der Nachweis der M₃- und M₄-Rezeptorsubtypen. Der M₅-Subtyp ließ sich mittels RT-PCR zwar nachweisen, im Western Blot gelang jedoch keine Bestätigung (27).

2.5.4. Effekte cholinergischer Stimulation im kornealen Epithel

1984 zeigte sich bei Kaninchen *in vivo* kein signifikanter Effekt von Pilocarpin -bis heute das am häufigsten verschriebene Cholinergikum in der Ophthalmologie (66)- auf die Wundheilung des kornealen Epithels (30). Experimente an Ratten zeigten *in vivo*

jedoch einen positiven Einfluss von Acetylcholin (29). Auch für den Einfluss von Pilocarpin finden sich Daten mit anderer Aussage. Eine Arbeit aus dem Jahr 1998 fand für Acetylcholin, Pilocarpin sowie Carbachol einen positiven Einfluss auf die Reepithelialisierung der Kornea von Kaninchen *in vivo* (28). Der Effekt von Carbachol war hier im Vergleich zu den beiden anderen Stimulantien etwas schwächer ausgeprägt, gegenüber der Kontrollgruppe jedoch weiter signifikant (28). Eine 2018 veröffentlichte Arbeit von Xue et al. fand *in vivo* bei Mäusen keinen positiven oder negativen Effekt von Pilocarpin. Eine Beschleunigung der Reepithelialisierung in der gleichen Arbeit gelang jedoch durch eine Stimulation der nikotinergen Acetylcholinrezeptoren (26).

Eine 2014 von Chernyavsky und Kollegen durchgeführte Studie zeigte einen positiven Effekt der cholinergen Stimulation auf die Migration sowie Adhäsionsfähigkeit kornealer Epithelzellen. Vermittelt wurden diese Effekte in dieser Studie sowohl durch die mAChRs als auch durch nikotinische Acetylcholinrezeptoren, wobei beide synergistisch wirken konnten. Neben diesen Effekten sicherte eine kontinuierliche cholinerge Stimulation auch ein verstärktes Überleben (27). Auch die Steigerung der Expression von E-Cadherin wird im kornealen Epithel offenbar durch beide Arten cholinergere Rezeptoren synergistisch vermittelt (102). E-Cadherin spielt eine wichtige Rolle in der Adhäsion zwischen Zellen und somit für einen entscheidenden Teil der Wundheilung.

Auch der Einfluss von Atropin auf korneale Epithelzellen wurde untersucht. Atropin wirkt antagonistisch an den mAChRs und findet in der Augenheilkunde Verwendung als Mydriatikum (66). *In Vitro* Studien aus dem Jahr 2015 zeigen verschiedene Effekte einer Stimulation mit Atropin auf korneale Epithelzellen. So zeigte sich in der angesprochenen Arbeit (abhängig von der verwendeten Dosis Atropin sowie der vergangenen Zeit) ein hemmender Effekt des Atropins auf die Proliferations- sowie Lebensfähigkeit der Zellen. Zusätzlich wirkte Atropin apoptotisch und die Zellen bildeten abnormale Morphologien aus (31). Ein hemmender Effekt von Atropin auf die Reepithelialisierung der Kornea zeigt sich auch bei der Maus (26).

Für Pilocarpin ist ebenfalls ein zytotoxischer Effekt auf humane Zellen des Korneaepithels beschrieben, jedoch erst bei sehr hohen Dosen (97).

2.6. Zusammenfassung

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass das Epithel der menschlichen Kornea offenbar verschiedene adrenerge sowie muskarinerge Rezeptoren exprimiert. Die Frage ob und wie stark die Wundheilung in diesem Bereich durch die Stimulation entsprechender Rezeptoren -und somit durch die Teilsysteme des ANS- beeinflussbar ist, wird jedoch in der Literatur unterschiedlich bewertet. Aufgrund der Häufigkeit von Schädigungen des kornealen Epithels im klinischen Alltag sind weitere Untersuchungen zu dessen Abheilung sowie zu möglichen medikamentösen Therapieansätzen zur Beschleunigung der Reepithelialisierung von hohem medizinischem Interesse.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Geräte

Gerät	Hersteller
Inkubator Modell 311	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Laborwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Lichtquelle Intensilight C-HGFI	Nikon Instruments Europe B.V., Amsterdam Niederlande
Mikroskop Nikon Eclipse TS 100	Nikon Instruments Europe B.V., Amsterdam Niederlande
Mikroskop Typ 090-135.002	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikrotiterplatten Lesegerät Multiskan Ascent, Typ 354	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Pipettierhelfer (elektronisch) RF 3000®	Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA
Sterilbank Nunc S@fe flow 1.2	EuroClone, Pero, Italien
Wasserbad WBT-Serie	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zählkammer (Neubauer), Tiefe 0,100mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland

Zählmaus Neolab Tally Counter	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Zentrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Rotanta	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tübingen, Deutschland

3.1.2. Software

Programmname	Version	Hersteller
Ascent™ Software	2.6	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
GraphPad Prism	9.5.1	GraphPad Software 225 Franklin Street. Fl. 26 Boston, MA 02110
imageJ	5	National Institutes of Health, Bethesda (Maryland), USA
Microsoft® Excel für Mac	16.44	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
NIS-Elements	4.30	Nikon Instruments Europe B.V., Amsterdam Niederlande
SPSS	23	IBM Corporation, Armonk, (New York), USA

3.1.3. Chemikalien

Name	Hersteller	Katalog-/Bestellnummer
-------------	-------------------	-------------------------------

Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA	A4544-100G
Carbachol	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA	Y0000113
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	A994.2
DMEM/F12 Ham;	Sigma-Aldrich/Biochrome	FG 4815
DMEM/F-12; phenolrotfrei	Thermo Scientific, Gibco, Waltham, Massachusetts, USA	21041025
DPBS (kein Calcium, Kein Magnesium)	Thermo Scientific, Gibco, Waltham, Massachusetts, USA	14190094
FKS	Thermo Scientific, Gibco, Waltham, Massachusetts, USA	A4766801
MTS (Cell Titer 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay)	Promega Corporation, Fitchburg (Wisconsin), USA	G3582
Noradrenalin (Arterenol®, 1mg/ml)	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland	PZN: 03870227
PenStrep	Thermo Scientific, Gibco, Waltham, Massachusetts, USA	15140122
Phenylephrin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA	P1240000
Trypanblau	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA	111732

3.1.4. Verbrauchsmaterial

Name	Hersteller
Flaschenaufsatzfilter 250ml	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Pasteurpipetten, Glas, 150mm	VWR International LLC, Radnor (Pennsylvania), USA
Pasteurpipetten, Glas, lange Form, 230mm	DWK Life Sciences, Wertheim, Deutschland
Pipette, 0,5-10 µl	Nichiryo Co., LTD., Tokyo, Japan
Pipette, 10-100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette 100-1000 µl	Nichiryo Co., LTD., Tokyo, Japan
Pipetten (serologisch) 5ml; Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Pipetten (serologisch) 10ml; Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Pipetten (serologisch) 25ml; Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen epT.I.P.S.® 0.1-10 Mikroliter	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen epT.I.P.S.® 2-200 Mikroliter	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen epT.I.P.S.® 50-1000 Mikroliter	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Safe-Lock Tubes 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Safe-Lock Tubes 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Wägebapier	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland

Zellkulturflaschen 200ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Zellschaber (costar®)	Corning incorporated, Corning, New York
Zentrifugenröhrchen, 15ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zentrifugenröhrchen 50ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
24-Well-Platte (Cellstar®)	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
96-Well-Platte (costar®)	Corning incorporated, Corning, New York

3.1.5. Zelllinie

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden mit einer 1995 von Araki-Sasaki und Kollegen etablierten Zelllinie durchgeführt (103). Hierbei handelt es sich um Zellen des menschlichen Korneaepithels, die mit Hilfe eines SV40-Adenoviruses immortalisiert wurden. Nach Angaben der Autoren produziert die Zelllinie keine freien Viruspartikel, verdoppelt sich alle 24,4 Stunden und erlaubt über 100 Passagen. Werden Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt wieder aufgetaut, hat dies keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten (103). In den hier durchgeführten Experimenten wurden Passagen der Generationen 39 bis 54 verwendet.

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkulturen

Die Durchführung sämtlicher Versuche erfolgte mit der im vorherigen Kapitel beschriebenen Zellreihe.

Die Zellen wurden innerhalb von 200 ml fassenden Flaschen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Hierzu wurde Vollmedium (DMEM/F-12 mit Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FKS) und 2% PenStrep) verwendet. 10% FKS stellen eine übliche Konzentration dar (104). Außerhalb der Nutzung wurde das Medium bei 4° Celsius

gelagert. Vor der Verwendung wurde es in einem Wasserbad aufgewärmt. Das FKS wurde vor der Beimischung in das Medium unter sterilen Bedingungen filtriert. Vor der Zugabe zum Medium wurden FKS sowie PenStrep bei -20°C gelagert.

Das Medium innerhalb der Kulturflaschen wurde täglich auf Trübungen oder einen Farbumschlag als Zeichen des Verbrauches kontrolliert und bei Bedarf gewechselt. Ebenfalls täglich erfolgten mikroskopische Kontrollen der wachsenden Zellen.

War der Boden einer Flasche zu etwa 90% mit vitalen Zellen bedeckt, so wurden die Zellen passagiert und auf mehrere Kulturflaschen aufgeteilt. Hierzu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit etwa 10 ml DPBS gewaschen, anschließend wurden die Zellen nach Zugabe von 2 ml Trypsin für 5 Minuten inkubiert. Mit dem Mikroskop wurde kontrolliert, ob sich alle Zellen erfolgreich abgelöst hatten. War dies nicht der Fall erfolgte dies durch manuelles Beklopfen der Kulturflasche oder mit Hilfe eines Zellschabers. Der Trypsinverdau wurde in der Folge durch die Zugabe von etwa 5 ml Medium gestoppt, die Suspension in einen Falcon überführt, zentrifugiert (1000 rpm), erneut resuspendiert und auf mehrere Flaschen aufgeteilt. Die Nummer der Zellpassage wurde entsprechend erhöht. Die genaue Anzahl an neu angesetzten Kulturflaschen war abhängig von der jeweiligen Größe des Zellpellets.

Bestanden Anzeichen für eine Infektion einer Kulturflasche, beispielsweise deutlich eingetrübtes Medium, so wurden die entsprechenden Zellen verworfen und nicht mehr für die Experimente genutzt.

Das Trypsin wurde in 2 ml Tubes bei -20°C gelagert. Auch das MTS wurde bei diesen Temperaturen unter Schutz vor der Einwirkung von UV-Licht gelagert.

Das DPBS wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Phenylephrin, Noradrenalin und Carbachol wurden bei -20°C gelagert, Noradrenalin dabei unter Schutz vor UV-Licht. Die Konzentration dieser drei Stimulantien betrug in allen Versuchen 10^{-6} M , eine für ähnliche Experimente übliche Dosierung (21, 23, 25, 105). Um der Zersetzung von Noradrenalin vorzubeugen, wurde in den entsprechenden Gruppen jeweils auch Ascorbinsäure zugesetzt (106). Die Ascorbinsäure wurde als Pulver unter UV-Schutz bei Raumtemperatur gelagert. Die für einen Versuchsansatz nötige Menge wurde jeweils abgewogen und in purem DMEM aufgelöst. Diese Lösung wurde unter sterilen Bedingungen filtriert. Konzentration der Ascorbinsäure in allen Versuchen war 10^{-4} M .

Alle Chemikalien wurden vor ihrer Verwendung in einem 37°C warmem Wasserbad erwärmt.

War absehbar, dass die Zellen eine längere Zeit nicht für Experimente genutzt werden können, so wurden sie bei -80°C eingefroren. Um eine dauerhafte Schädigung der Zellen durch eine potentielle Bildung von Eiskristallen zu vermeiden, wurde vor dem Einfrieren DMSO zugesetzt.

3.2.2. Literatursuche

Zu Beginn erfolgte eine orientierende Suche nach entsprechender Literatur mit PUBMED und MEDLINE. Hierzu wurden die Suchbegriffe *cornea, epithel, epithelium, corneal epithel, corneal epithelium, adrenoceptors, adrenergic receptors, cholinergic receptors, muscarin receptors, muscarinergic receptors, wound healing, wound closure, regeneration* unterschiedlich kombiniert. Im weiteren Verlauf erfolgte die ergänzende Literaturrecherche gezielt mit Hilfe von PUBMED und Google Scholar.

Bezüglich der anatomischen und physiologischen Grundlagen wurden entsprechende Lehrbücher verwendet.

Die klinische Relevanz der verwendeten Stimulantien und zugrunde liegenden klinischen Fragestellung wurde anhand von Leitlinien der AWMF beziehungsweise DOG sowie ophthalmologischer Lehrbücher nachvollzogen. Für genauere Informationen über entsprechende Medikamente wurden jeweils die veröffentlichten Fachinformationen genutzt.

Statistiken über das Krankheitsgeschehen in der BRD wurden entsprechenden Berichten des statistischen Bundesamtes sowie des Robert-Koch-Institutes entnommen.

3.2.3. Proliferationsassays

Aus den Kulturflaschen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend erfolgten die Zugabe von 2 ml Trypsin und nach 5 Minuten Inkubationszeit wurde mikroskopisch kontrolliert, ob die Zellen sich vom Flaschenboden abgelöst hatten. Die abgelösten Zellen wurden in 5 ml Medium resuspendiert und in einen 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Suspension wurde für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zentrifugat erneut in 1ml Medium resuspendiert. Die Zelldichte wurde mithilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Beide Seiten der Kammer wurden jeweils mit 10 µl

der Suspension befüllt. Es wurden jeweils die vier großen Quadrate ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Unter Berücksichtigung von Kammerdicke und Verdünnungsfaktor wurde die Anzahl an Zellen innerhalb eines ml errechnet. Von diesem Wert ausgehend ließ sich berechnen, wie das Mischverhältnis zwischen dieser Suspension und zellfreiem Vollmedium sein musste, um eine Aussaat der gewünschten Zellzahl pro Well zu erreichen.

Auf einer 24-Well Platte wurden in insgesamt 12 Wells je 20.000 Zellen in einem ml Vollmedium ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Nach einem Tag wurde kontrolliert, ob die Zellen erfolgreich angewachsen waren. War dies der Fall, so wurde das Vollmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült und es erfolgte eine Stimulation entsprechend der beiden nachfolgenden Schemata:

Tabelle 1: Stimulationsschema A

Gruppe	Stimulation
1	DMEM + 2% FKS (Negativkontrolle)
2	DMEM + 10% FKS (Positivkontrolle)
3	DMEM + 2% FKS + Phenylephrin
4	DMEM + 2% FKS + Carbachol

Tabelle 2: Stimulationsschema B

Gruppe	Stimulation
1	DMEM + 2% FKS (Negativkontrolle)
2	DMEM + 10% FKS (Positivkontrolle)
3	DMEM + 2% FKS + Noradrenalin + Ascorbinsäure
4	DMEM + 2% FKS + Noradrenalin

Von diesem Zeitpunkt an, wurden alle 24h mikroskopisch Vitalität und Wachstum der Zellen überprüft; es erfolgte ein Wechsel des Stimulans inklusive Waschvorgang mittels PBS. Pro Durchgang wurden drei 24-Well-Platten aus einer Kulturflasche angesetzt, jeweils nach drei, fünf und sieben Tagen erfolgte die Auszählung einer

Platte. Hierfür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült und für 5 Minuten ein Trypsinverdau gestartet (100 Mikroliter pro Well). Mikroskopisch wurde kontrolliert, ob sich alle Zellen erfolgreich abgelöst hatten. War dies nicht der Fall, so wurden mittels Zellschaber oder vorsichtigem Beklopfen der Platte die übrigen Zellen manuell abgelöst. Der Trypsinverdau wurde durch Zugabe von 200 Mikrolitern Vollmedium gestoppt und die Lösung wurde für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt, die Zellen wurden in 500 Mikroliter PBS resuspendiert. Aus dieser Suspension wurden anschließend 10 Mikroliter entnommen und diese im Verhältnis 1:5 verdünnt (mit PBS). Zur besseren mikroskopischen Darstellbarkeit der vitalen Zellen wurde mit der gleichen Menge an Trypanblau aufgefüllt, wodurch abgestorbene Zellen sich blau anfärbten. Lebendige Zellen dagegen nahmen aufgrund der intakten Zellmembran keine Blaufärbung an.

Die Auszählung der Zellen erfolgte anschließend nach dem oben beschriebenen Schema mittels Neubauer Zählkammer. Aus den sechs Einzelwerten jeder Gruppe wurde ein Mittelwert gebildet und mit diesem die Zahl der Zellen pro ml errechnet.

3.2.4. Migrationsassays

Die Ablösung der Zellen und Bestimmung der Zelldichte innerhalb der Kultur erfolgte wie bereits in 3.2.3 beschrieben.

Eine der bereits erwähnten 24-Well-Platten wurde mit Einsätzen der Firma ibidi® bestückt, mit deren Hilfe ein künstlicher, zellfreier Spalt von etwa 500 Mikrometern innerhalb des Wells geschaffen wurde. Es wurden Suspensionen mit $7 \cdot 10^5$ Zellen pro ml Vollmedium hergestellt; jeweils 70 Mikroliter dieser Suspension wurden auf beiden Seiten eines Einsatzes ausgesät. Anschließend wurden diese Zellen für 24h inkubiert (107).

Am Folgetag wurde mikroskopisch das erfolgreiche Anwachsen der Zellen kontrolliert. Unter sterilen Bedingungen wurden die Einsätze mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig entfernt, das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1ml PBS gewaschen und nach den beiden in Kapitel 3.2.3 beschriebenen Schemata stimuliert.

Die Spaltgröße wurde fotografisch dokumentiert, dabei wurde der Spalt immer horizontal ausgerichtet. Die ersten Bilder wurden umgehend nach erfolgter Stimulation aufgenommen (Zeitpunkt 0h) und dienten gleichzeitig der Kontrolle einer erfolgreichen Spaltbildung. Weitere Bilder wurden nach 3h, 6h, 9h und 24h aufgenommen. Die Auswertung der Spaltgröße erfolgte mit dem Programm imageJ.

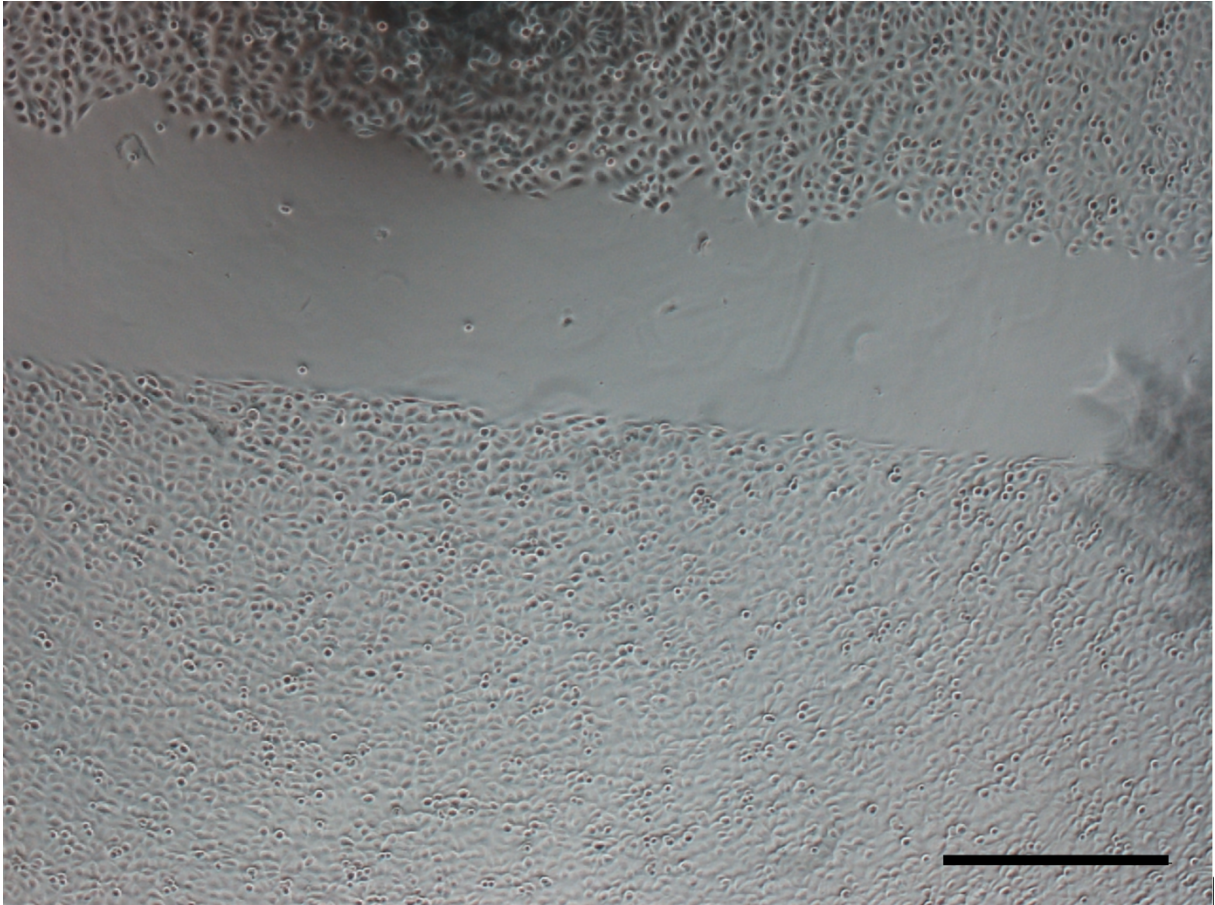


Abbildung 3: Beispielbild des künstlichen Spaltes im Migrationsassay: Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel innerhalb eines Spalts zum Zeitpunkt 0h. In der Mitte des Wells hat sich ein Spalt gebildet, der von Zellansammlungen umgeben wird. Einzelne, abgelöste Zellen befinden sich hier scheinbar im Bereich des Spaltes. Im Bild rechts ist eine absichtlich gesetzte Markierung erkennbar, anhand dieser lässt sich zu jedem Zeitpunkt die gleiche Stelle innerhalb des Wells einstellen. Der schwarze Balken unten rechts im Bild markiert eine Breite von 500 μm . (Bild: Maximilian Rink)

3.2.5. MTS-Assays

Die Ablösung der Zellen und Bestimmung der Zelldichte innerhalb der Kultur erfolgte wie bereits in 3.2.3 beschrieben.

Anschließend wurden auf einer 96-Well Platte 25.000 Zellen pro Well in Vollmedium ausgesät. Es folgte eine 24-stündige Inkubationszeit im Inkubator unter den beschriebenen Standardbedingungen, während der die Zellen anwachsen sollten. Am Folgetag (Tag 1) wurde das Vollmedium vorsichtig abgesaugt, ausgiebig mit PBS gespült und es erfolgte eine Stimulation der Zellen getreu nachfolgendem Schema:

Tabelle 3: Stimulationsgruppen MTS

Gruppe	Stimulation
1	DMEM + 2% FKS (Negativkontrolle)
2	DMEM + 10% FKS (Positivkontrolle)
3	DMEM + 2% FKS + Noradrenalin + Ascorbinsäure
4	DMEM + 2% FKS + Noradrenalin
5	DMEM + 2% FKS + Phenylephrin
6	DMEM + 2% FKS + Carbachol

Ab diesem Schritt erfolgte die Verwendung von phenolrotfreiem Medium um später die jeweilige Absorption messen zu können. Die Zellen wurden nun erneut für 24 Stunden inkubiert.

An Tag 2 wurden zu jedem Well 20 Mikroliter MTS hinzugegeben. Das MTS wird durch vitale, stoffwechselaktive Zellen innerhalb der Wells zunehmend zu Formazan umgesetzt (vgl. untenstehende Abbildung aus (108)). Ursächlich hierfür sind NAD(P)H-abhängige Dehydrogenasen. Die Menge an entstehendem Formazan ist dabei proportional zur Menge der vitalen, Stoffwechsel betreibenden Zellen. Das Medium verfärbt sich im Rahmen dieser Reaktion zunehmend ins Rotbraune. Nach 1,2,3 und 4 Stunden wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm (entspricht dem Absorptionsmaximum des Formazans) gemessen. Dies erfolgte mit dem Programm Ascent™ Software. Diese Durchführung entspricht den Vorgaben des Herstellers (108).

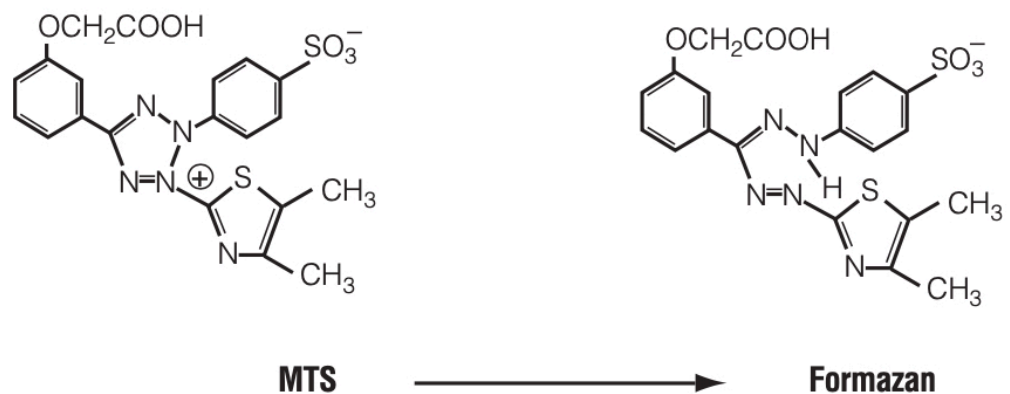


Abbildung 4: Umsetzung von MTS zu Formazan Gezeigt ist die Umsetzung des MTS zum Formazan. (Abbildung aus (108)).

Um auszuschließen, dass das Medium als solches oder eines der Stimulantien die Absorption beeinflussen, wurden jeweils Leerkontrollen ohne Zellen mitgeführt. Es erfolgte eine Auswertung der absoluten Absorptionswerte unter Berücksichtigung der Leerkontrollen. Insgesamt erfolgten dabei sechs Durchführungen. Die Anzahl der biologischen Replikate in jeder der Gruppen aus Tabelle 3 betrug bei jeder Durchführung drei.

Eine verstärkte Umsetzung von MTS zu Formazan bewirkt eine stärkere Absorption und zeigt eine höhere Anzahl von stoffwechselaktiven Zellen innerhalb des betreffenden Wells an. Diese kann durch eine verstärkte Proliferation, eine erhöhte Stoffwechselaktivität, oder ein besseres Überleben der ursprünglich ausgesäten Zellen verursacht sein.

3.2.6. Statistische Auswertung

Die Messergebnisse wurden in Microsoft Excel, SPSS sowie GraphPad Prism übertragen. Die Berechnung deskriptiver statistischer Werte erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel, die Boxplots wurden mit SPSS erstellt. Weitergehende statistische Tests sowie die Erstellung der Graphen erfolgten mit GraphPad Prism. Zur Analyse der Varianz wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Messwiederholung durchgeführt. Die hierfür genutzten Messungen erfolgten voneinander unabhängig. Eine Normalverteilung in der entsprechenden Gruppe wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test (Signifikanzniveau $\alpha=0.05$) überprüft, nach Ausreißern wurde in den jeweiligen Boxplots gesucht. Varianzhomogenität wurde mit dem Levene-Test untersucht. Als Post-hoc-Test wurde der Tukey-Test durchgeführt (Signifikanzniveau $\alpha=0,05$).

4. Ergebnisse

4.1. Proliferation und Migration

4.1.1. Einfluss von Noradrenalin auf die Proliferation kornealer Epithelzellen

In der Abbildung Nummer fünf wird der Einfluss von Noradrenalin auf das Proliferationsverhalten gezeigt. Insgesamt wurden vier Gruppen miteinander verglichen. Eine Gruppe an Zellen erhielt 10% FKS und galt als Positivkontrolle, eine Gruppe mit lediglich 2% FKS als Negativkontrolle. Den übrigen stimulierten Zellen wurde ebenfalls 2% FKS hinzugegeben. Da beim relativ instabilen Noradrenalin die

Gefahr der Oxidation bestand, wurde zusätzlich Ascorbinsäure hinzugegeben. Um auszuschließen, dass eventuelle Effekte auf die Ascorbinsäure selbst zurückzuführen sind, wurde einer weiteren Gruppe lediglich Ascorbinsäure hinzugegeben.

Bei der Betrachtung der Kurvenverläufe (Abbildung 5) fällt auf, dass durch Ascorbinsäure alleine die Proliferation stärker gesteigert wird, als in der Kombination mit Noradrenalin. Dies deutet bereits auf einen hemmenden Einfluss des Noradrenalins auf das Proliferationsverhalten kornealer Epithelzellen hin. Zu allen Zeitpunkten bestanden Normalverteilung und Homogenität der Varianzen, die angefertigten Boxplots (s. Anhang 1) zeigten keine Ausreißer.

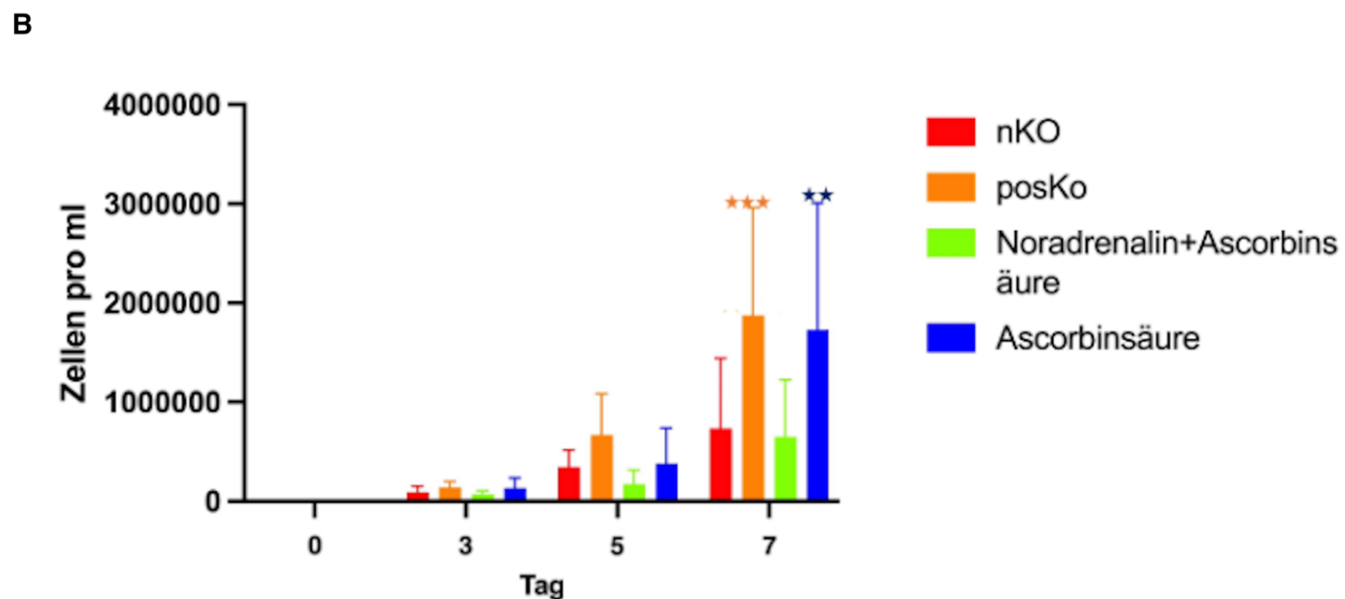
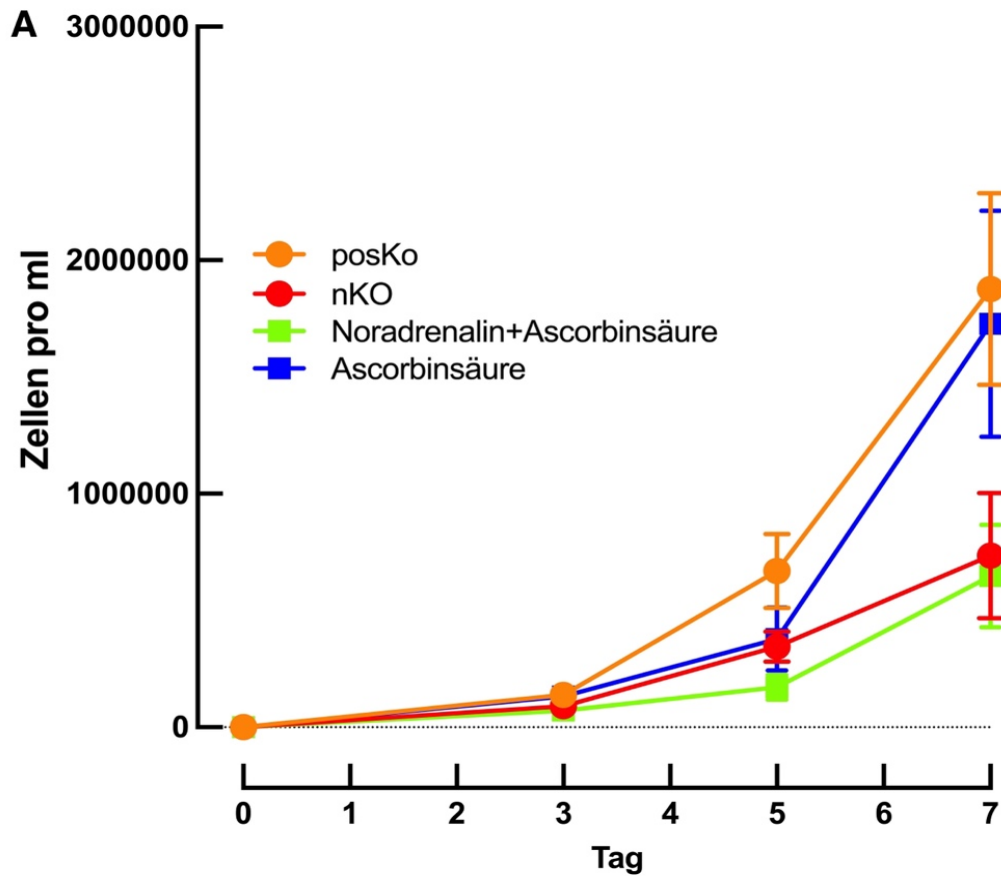


Abbildung 5: Einfluss von Noradrenalin und Ascorbinsäure auf die Proliferation. Dargestellt ist die Entwicklung der Zellzahl innerhalb einer Woche vom Zeitpunkt der Stimulation. Die Einzelversuche erfolgten unabhängig voneinander. Der Mittelwert einer Gruppe in einem Einzelversuch ergab sich immer aus 3 Wells. A) Als Kurvenverlauf gezeigt sind die Mittelwerte für $n=7$, als Fehlerindikator ist der Standardfehler dargestellt. B) Gezeigt sind die Mittelwerte für $n=7$, als Fehlerindikator ist die Standardabweichung dargestellt. Signifikante Ergebnisse gegenüber der Negativkontrolle sind gekennzeichnet (** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$). nKO = Negativkontrolle = DMEM + 2%FKS, posKO = Positivkontrolle = DMEM + 10%FKS, Noradrenalin und Ascorbinsäure = DMEM+ 2%FKS + 10^{-6} M Noradrenalin + 10^{-4} M Ascorbinsäure, Ascorbinsäure = DMEM+ 2%FKS + 10^{-4} M Ascorbinsäure.

An den Tagen 0, 3 und 5 bestanden zwischen den einzelnen Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Nach 7 Tagen Wachstum zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Positiv- und Negativkontrolle ($p=0,0003$). Die lediglich mit Ascorbinsäure stimulierte Gruppe zeigte eine signifikant höhere Zellzahl als die Gruppe, der Ascorbinsäure und Noradrenalin hinzugegeben wurde ($p=0,0006$). Signifikante Unterschiede bestanden zusätzlich zwischen Negativkontrolle und der Ascorbinsäuregruppe ($p= 0,0017$) sowie zwischen der Positivkontrolle und der Gruppe mit Noradrenalin und Ascorbinsäure ($p= <0,0001$).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse eine signifikante Verminderung der Proliferation der Zellen durch die Hinzugabe von Noradrenalin. Zusätzlich zeigt sich eine signifikante Steigerung der Proliferation durch Ascorbinsäure.

4.1.2. Einfluss von Phenylephrin und Carbachol auf die Proliferation kornealer Epithelzellen

In der Abbildung Nummer sechs wird der Einfluss von Phenylephrin sowie Carbachol auf das Proliferationsverhalten gezeigt. Insgesamt wurden vier Gruppen miteinander verglichen. Eine Gruppe an Zellen erhielt 10% FKS und galt als Positivkontrolle, eine Gruppe mit lediglich 2% FKS als Negativkontrolle. Den mit Phenylephrin beziehungsweise Carbachol stimulierten Zellen wurde ebenfalls 2% FKS hinzugegeben.

Zu allen Zeitpunkten bestand Normalverteilung. Die Boxplots zeigten für Tag 5 und Tag 7 jeweils einen leichten Ausreißer (an Tag 5 in der Gruppe mit Phenylephrin, an Tag 7 in der Gruppe mit 10% FKS). Die Ausreißer wurden wie alle anderen Werte in die Berechnung einbezogen. Für Tag 3 und Tag 7 bestand Varianzhomogenität, Tag

5 zeigte einen signifikanten Levene-Test ($p = 0,013$). Die Boxplots zeigt Anhang Nummer 2.

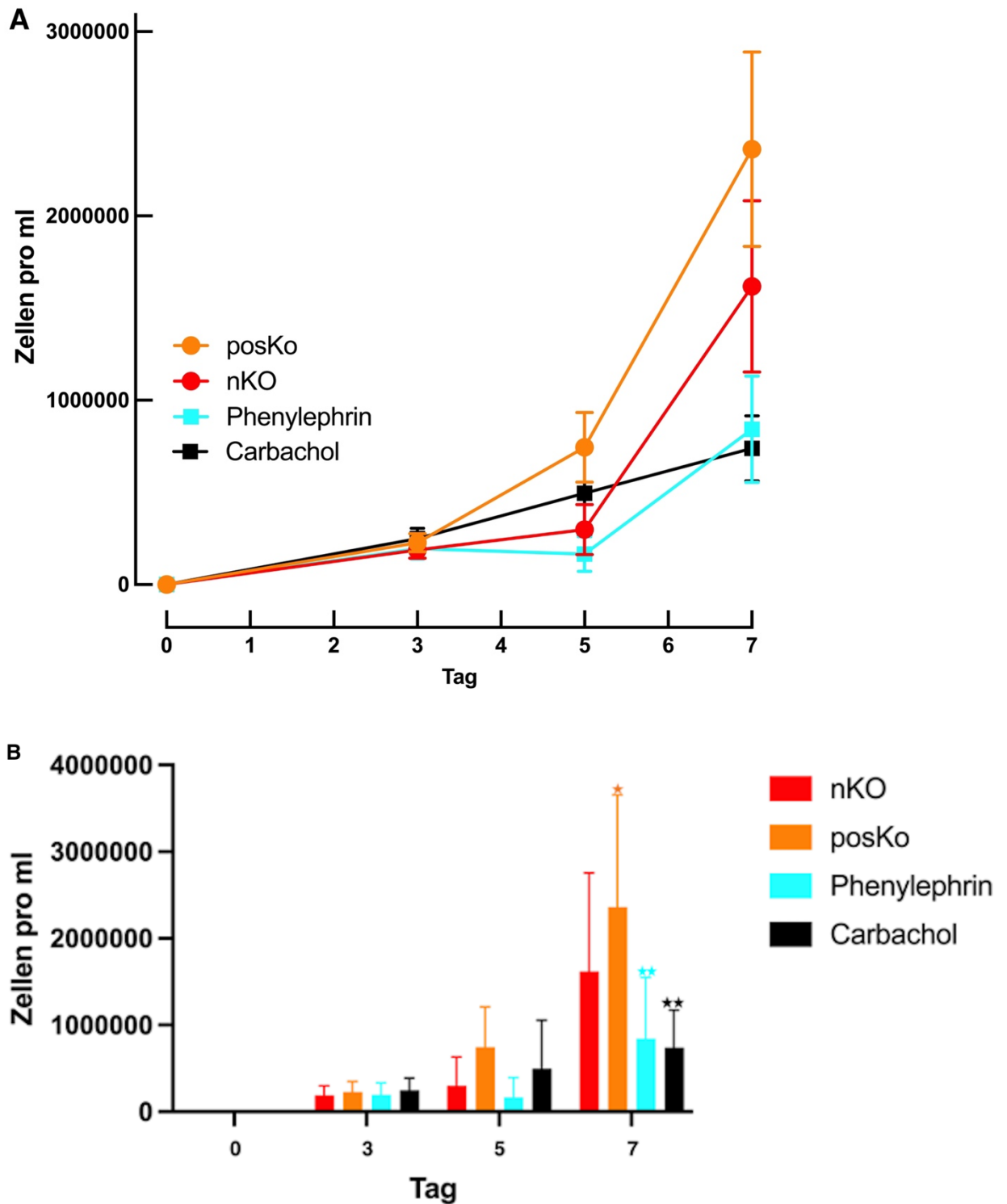


Abbildung 6: Einfluss von Phenylephrin und Carbachol auf die Proliferation. Dargestellt ist die Entwicklung der Zellzahl innerhalb einer Woche vom Zeitpunkt der Stimulation. Die Einzelversuche erfolgten unabhängig voneinander. Der Mittelwert einer Gruppe in einem Einzelversuch ergab sich immer aus 3 Wells. A) Als Kurvenverlauf gezeigt sind die Mittelwerte für $n=5$, als Fehlerindikator ist der Standardfehler dargestellt. B) Gezeigt sind die Mittelwerte für $n=5$, als Fehlerindikator ist die Standardabweichung dargestellt. Signifikante Ergebnisse gegenüber der Negativkontrolle sind gekennzeichnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$). nKO = Negativkontrolle = DMEM + 2%FKS, posKO = Positivkontrolle = DMEM + 10%FKS, Phenylephrin = DMEM + 2%FKS + 10^{-6} M Phenylephrin, Carbachol = DMEM + 2%FKS + 10^{-6} M Carbachol.

An den Tagen 0 und 3 bestanden zwischen den einzelnen Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede. An Tag 5 zeigte sich ein schwach signifikanter Unterschied zwischen der Positivkontrolle sowie der mit Phenylephrin stimulierten Gruppe ($p=0,0437$).

Nach 7 Tagen Wachstum zeigten sich hochsignifikante Unterschiede zwischen der Positivkontrolle und den mit Phenylephrin beziehungsweise Carbachol stimulierten Gruppen (jeweils $p < 0,0001$). Zusätzlich fand sich eine signifikante Abschwächung der Proliferation durch Carbachol im Vergleich zur Negativkontrolle ($p= 0,0009$), gleiches gilt für den Vergleich zwischen der mit Phenylephrin stimulierten Gruppe sowie der Negativkontrolle ($p= 0,0038$) sowie den Vergleich zwischen Positiv- und Negativkontrolle nach 7 Tagen ($p= 0,0057$).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse eine signifikante Abschwächung der Proliferation durch Carbachol und Phenylephrin.

4.1.3. Einfluss von Noradrenalin auf die Migration kornealer Epithelzellen

Abbildung Nummer sieben zeigt den Einfluss von Noradrenalin auf das Migrationsverhalten kornealer Epithelzellen. Beim Vergleich der Kurven für die Gruppen mit Noradrenalin und Ascorbinsäure sowie der Gruppe mit ausschließlich Ascorbinsäure zeigt sich ein nahezu paralleler Verlauf, gleiches gilt im Vergleich der Kurvenverläufe für Negativ- und Positivkontrolle (die Gruppen entsprechen den in Kapitel 4.1.1. bereits definierten).

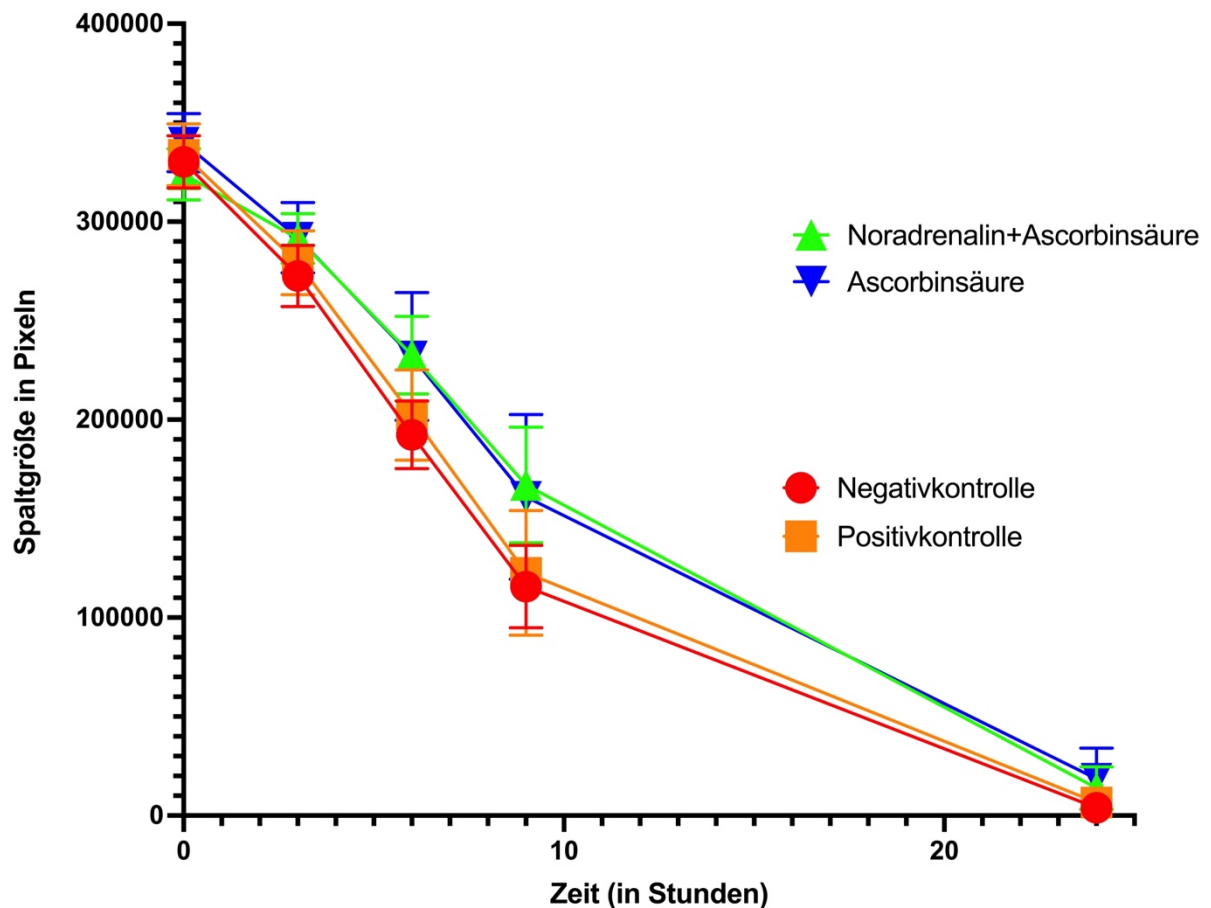


Abbildung 7: Einfluss von Noradrenalin auf die Migration. Dargestellt ist die Entwicklung der Spaltgröße (angegeben in Pixeln) innerhalb von 24 Stunden nach der Stimulation. Gezeigt sind die Mittelwerte für n=6 sowie der Standardfehler als Fehlerindikator. Die Einzelversuche erfolgten unabhängig voneinander. Der Mittelwert einer Gruppe in einem Einzelversuch ergab sich immer aus 3 Wells. Negativkontrolle = DMEM + 2%FKS, Positivkontrolle = DMEM + 10%FKS, Noradrenalin und Ascorbinsäure = DMEM+ 2%FKS + 10^{-6} M Noradrenalin + 10^{-4} M Ascorbinsäure, Ascorbinsäure = DMEM+ 2%FKS + 10^{-4} M Ascorbinsäure.

Für die Zeitpunkte 0, 3, 6 und 9 Stunden waren Normalverteilung und Varianzhomogenität in allen Gruppen gegeben. Innerhalb dieser Zeitpunkte fand sich lediglich ein leichter Ausreißer zum Zeitpunkt null Stunden in der mit Ascorbinsäure stimulierten Gruppe. Der Ausreißer wurde wie die anderen Werte in die Berechnungen eingeschlossen. Zum Zeitpunkt 24 Stunden lag keine Normalverteilung der Werte vor und es fanden sich mehrere Ausreißer. Die zugehörigen Boxplots zeigt Anhang 3. Varianzhomogenität war weiterhin gegeben.

Zu den Zeitpunkten 0, 3 und 24 Stunden bestanden keine signifikanten Differenzen zwischen den verschiedenen Gruppen. Zu keinem Zeitpunkt bestanden Signifikanzen beim Vergleich der mit Noradrenalin und Ascorbinsäure stimulierten Gruppe mit der ausschließlich durch Ascorbinsäure stimulierten. Tabelle 4 zeigt exemplarisch die p-Werte für die Vergleiche dieser beiden Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten.

Für die Zeitpunkte 6 und 9 Stunden fanden sich signifikante Differenzen zwischen allen Ascorbinsäure enthaltenden Gruppen, sowie beide Kontrollen. Tabelle 5 zeigt den Vergleich zwischen Positiv- wie Negativkontrolle und der mit Ascorbinsäure stimulierten Gruppe zu den verschiedenen Zeitpunkten.

Tabelle 4: Ergebnisse Migrationsassay Noradrenalin, Vergleich der beiden Gruppen mit Ascorbinsäure. Gezeigt ist jeweils der p-Wert für den Vergleich der Gruppe Noradrenalin+Ascorbinsäure mit der Gruppe Ascorbinsäure.

Zeitpunkt	p=
0 Stunden	0,460
3 Stunden	>0,999
6 Stunden	>0,999
9 Stunden	0,946
24 Stunden	0,974

Tabelle 5: Ergebnisse Migrationsassay Noradrenalin, Vergleich zu den Kontrollgruppen. Gezeigt ist jeweils der p-Wert für den Vergleich der Gruppe Ascorbinsäure mit der Positiv- beziehungsweise Negativkontrolle.

Zeitpunkt	Vergleich zur Positivkontrolle	Vergleich zur Negativkontrolle
0 Stunden	p= 0,944	p= 0,806
3 Stunden	p= 0,652	p= 0,297
6 Stunden	p= 0,042	p= 0,003
9 Stunden	p= 0,005	p= 0,001
24 Stunden	p= 0,691	p= 0,539

Zusammenfassend zeigt sich somit kein positiver oder negativer Einfluss der Stimulation mit Noradrenalin auf die Migration der kornealen Epithelzellen. Die Ascorbinsäure zeigt hier in unserer Arbeit einen hemmenden Effekt.

In der folgenden Abbildung Nummer acht ist exemplarisch dargestellt, wie der Spalt sich mit der Zeit zunehmend schließt.

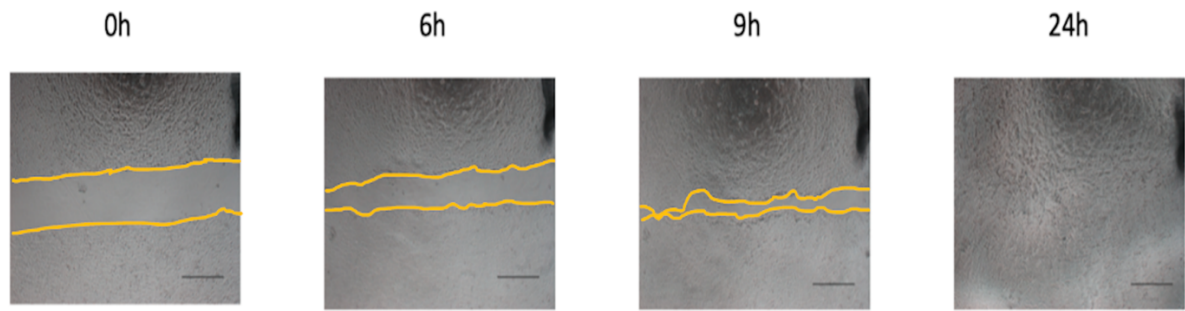


Abbildung 8: Beispiel zum Spaltverschluss im Migrationsassay. Gezeigt ist exemplarisch die Entwicklung der Spaltgröße im Rahmen der Versuche. Die Grenzen des Spaltes sind zur besseren Sichtbarkeit gelb eingezeichnet. Nach 24 Stunden ist der Spalt vollständig verschlossen. Oben rechts erkennt man jeweils eine absichtlich gesetzte schwarze Markierung, die der Orientierung dient. (Bilder: Maximilian Rink)

4.1.4. Einfluss von Phenylephrin und Carbachol auf die Migration kornealer Epithelzellen

Abbildung Nummer neun zeigt den Einfluss von Phenylephrin beziehungsweise Carbachol auf das Migrationsverhalten kornealer Epithelzellen. Beim Vergleich mit den Kurvenverläufen für Negativ- und Positivkontrolle (jeweils oben in Kapitel 4.1.2 bereits definiert) zeigt sich ein beinahe paralleler Verlauf.

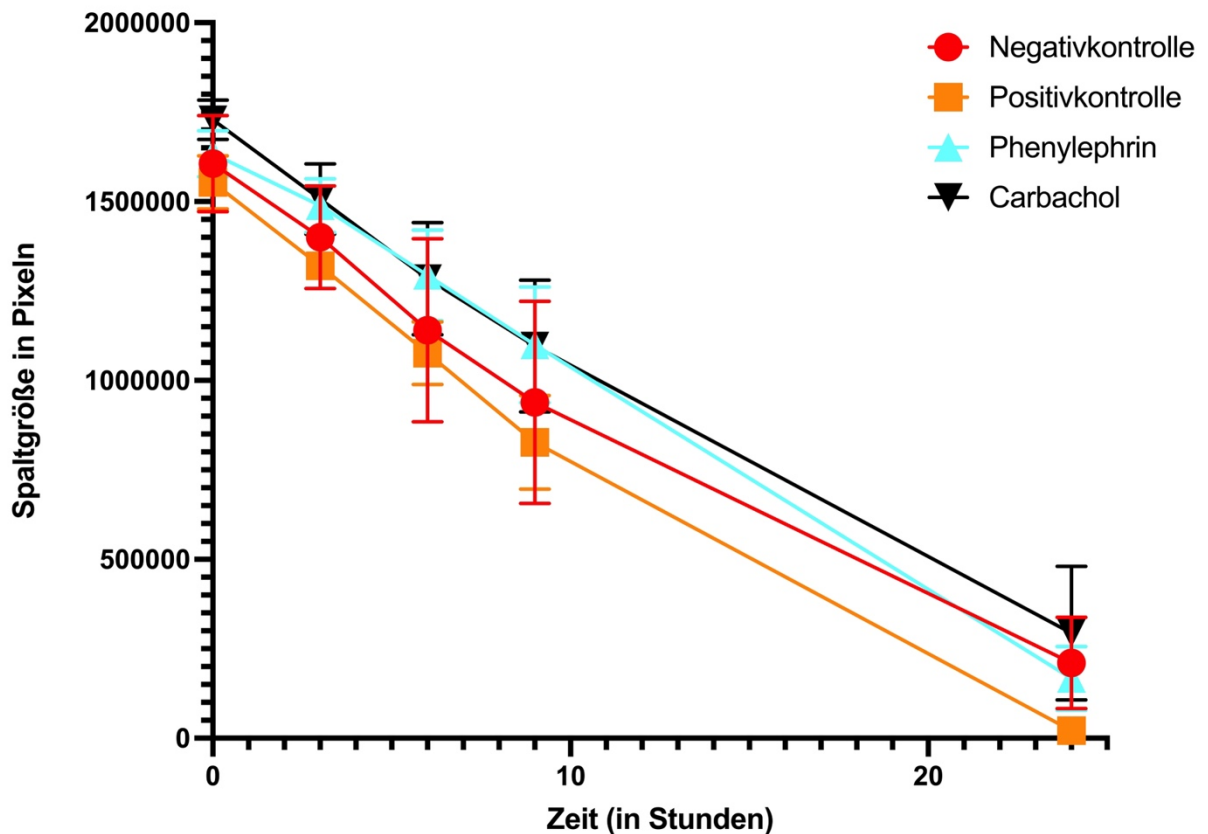


Abbildung 9: Einfluss von Phenylephrin und Carbachol auf die Migration. Dargestellt ist die Entwicklung der Spaltgröße (angegeben in Pixeln) innerhalb von 24 Stunden nach der Stimulation. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM für $n=3$, die Einzelversuche erfolgten unabhängig voneinander. Der Mittelwert einer Gruppe in einem Einzelversuch ergab sich immer aus 3 Wells. Negativkontrolle = DMEM + 2%FKS, Positivkontrolle = DMEM + 10%FKS, Phenylephrin = DMEM + 2%FKS + 10^{-6} M Phenylephrin, Carbachol = DMEM + 2%FKS + 10^{-6} M Carbachol

Zu jedem Zeitpunkt war Varianzhomogenität in allen Gruppen gegeben, es fanden sich keine Ausreißer in den Boxplots. Die Boxplots sind in Anhang 4 gezeigt. Für die Zeitpunkte 0h, 3h, 6h und 24h zeigten sämtliche Gruppen Normalverteilung, zum Zeitpunkt 9 Stunden waren alle Gruppen normalverteilt bis auf die Gruppe mit 10% FKS ($p= 0,012$).

Zu keinem Zeitpunkt bestanden beim Vergleich der mit Phenylephrin beziehungsweise Carbachol stimulierten Gruppen mit der Negativkontrolle signifikante Differenzen. Tabelle 6 zeigt exemplarisch die p-Werte für die Vergleiche dieser beiden Gruppen zur Negativkontrolle an den verschiedenen Zeitpunkten:

Tabelle 6: Ergebnisse Migrationsassay Phenylephrin und Carbachol. Gezeigt ist jeweils der Vergleich der Negativkontrolle mit den durch Phenylephrin beziehungsweise Carbachol stimulierten Gruppen

Zeitpunkt	Vergleich zur Gruppe mit Phenylephrin	Vergleich zur Gruppe mit Carbachol
0 Stunden	p= 0,974	p= 0,257
3 Stunden	p= 0,528	p= 0,366
6 Stunden	p= 0,111	p= 0,146
9 Stunden	p= 0,088	p= 0,096
24 Stunden	p= 0,911	p= 0,578

Zu verschiedenen Zeitpunkten bestanden signifikante Unterschiede zwischen der Positivkontrolle und einer der anderen drei Gruppen. Nach drei Stunden zwischen Positivkontrolle und der Gruppe mit Carbachol ($p=0,038$), nach sechs Stunden zwischen Positivkontrolle und Carbachol- ($p= 0,018$) sowie mit Phenylephrin stimulierter Gruppe ($p=0,013$) und nach neun Stunden ebenfalls beim Vergleich zwischen Positivkontrolle und den Gruppen mit Carbachol ($p= 0,002$) sowie Phenylephrin ($p= 0,002$). Nach 24 Stunden fanden sich Signifikanzen beim Vergleich von positiv- und Negativkontrolle ($p= 0,035$) sowie beim Vergleich der Positivkontrolle mit der durch Carbachol stimulierten Gruppe ($p= 0,002$).

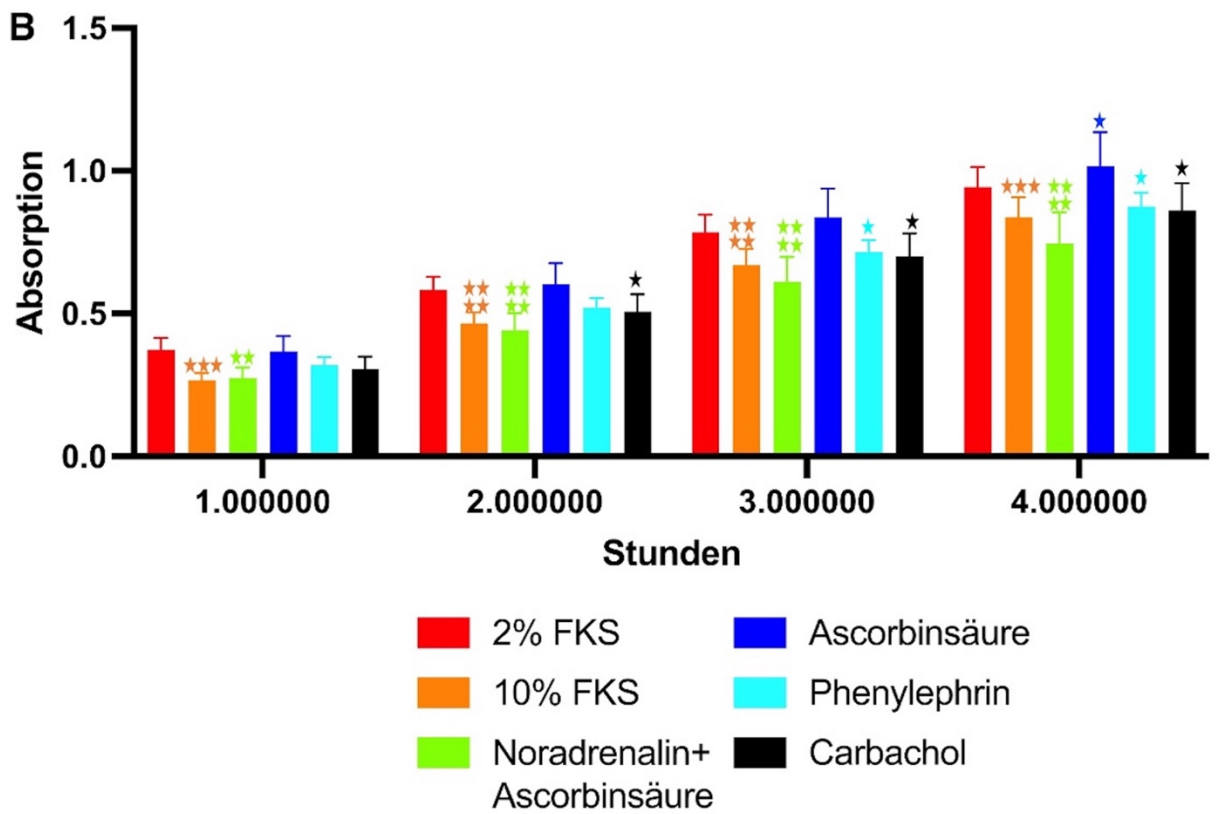
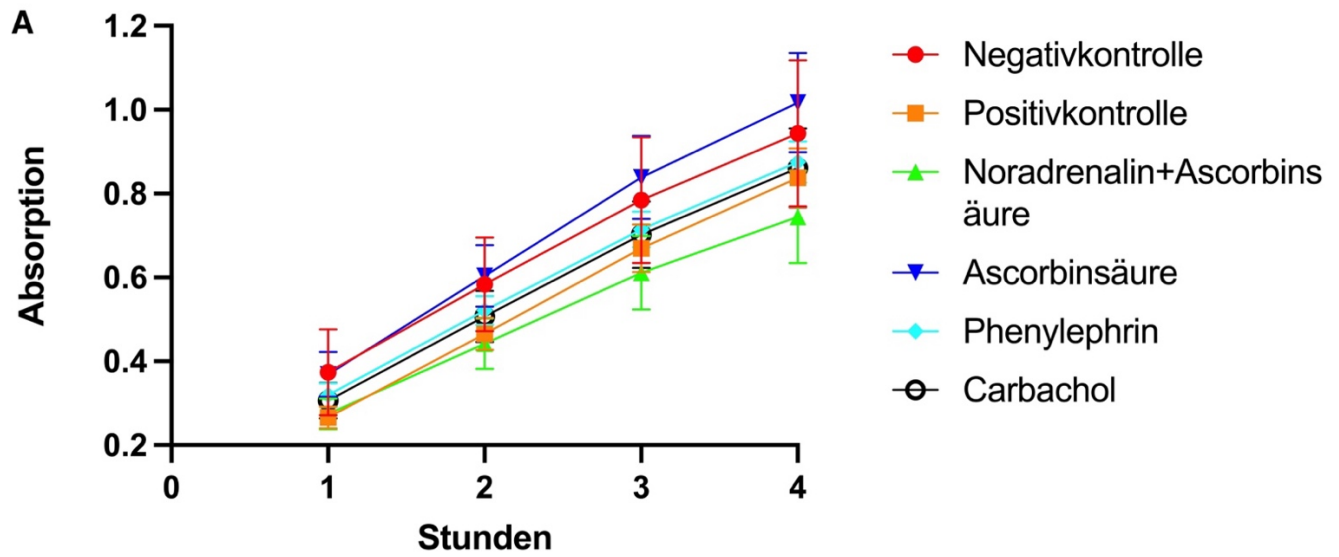
Zusammenfassend zeigt sich somit kein statistisch signifikanter Effekt von Phenylephrin sowie Carbachol auf das Migrationsverhalten kornealer Epithelzellen im Vergleich zur Negativkontrolle.

4.2. MTS

Zusätzlich wurde der Einfluss von Noradrenalin, Phenylephrin und Carbachol auf die Vitalität der Zellen untersucht. Hierzu erfolgte die Zugabe von MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). Dieses wird durch vitale, stoffwechselaktive Zellen zu Formazan umgesetzt, dessen Absorption wiederum gemessen werden kann. Da die Menge des entstehenden Formazans zur Menge der vitalen Zellen proportional ist, ist ein entsprechender Rückschluss möglich. Eine höhere Anzahl vitaler Zellen kann dabei durch eine verstärkte Proliferation, eine erhöhte Stoffwechselaktivität, oder ein besseres Überleben der ursprünglich ausgesäten Zellen verursacht sein.

In der Abbildung Nummer zehn sind die jeweiligen Absorptionen für die verschiedenen Stimulantien über vier Stunden im phenolrotfreien Medium dargestellt. Neben den Gruppen mit den entsprechenden Stimulantien, wurden auch eine Positiv- (10% FKS) sowie eine Negativkontrolle (2% FKS) mitgeführt.

Bei der Betrachtung des Diagrammes fällt die vergleichsweise geringe Absorption der Gruppe mit Noradrenalin und Ascorbinsäure auf, vor allem verglichen mit der nur mit Ascorbinsäure stimulierten Gruppe. Zusätzlich fällt die konstant geringere Absorption der Positivkontrolle im Vergleich zur Negativkontrolle auf.



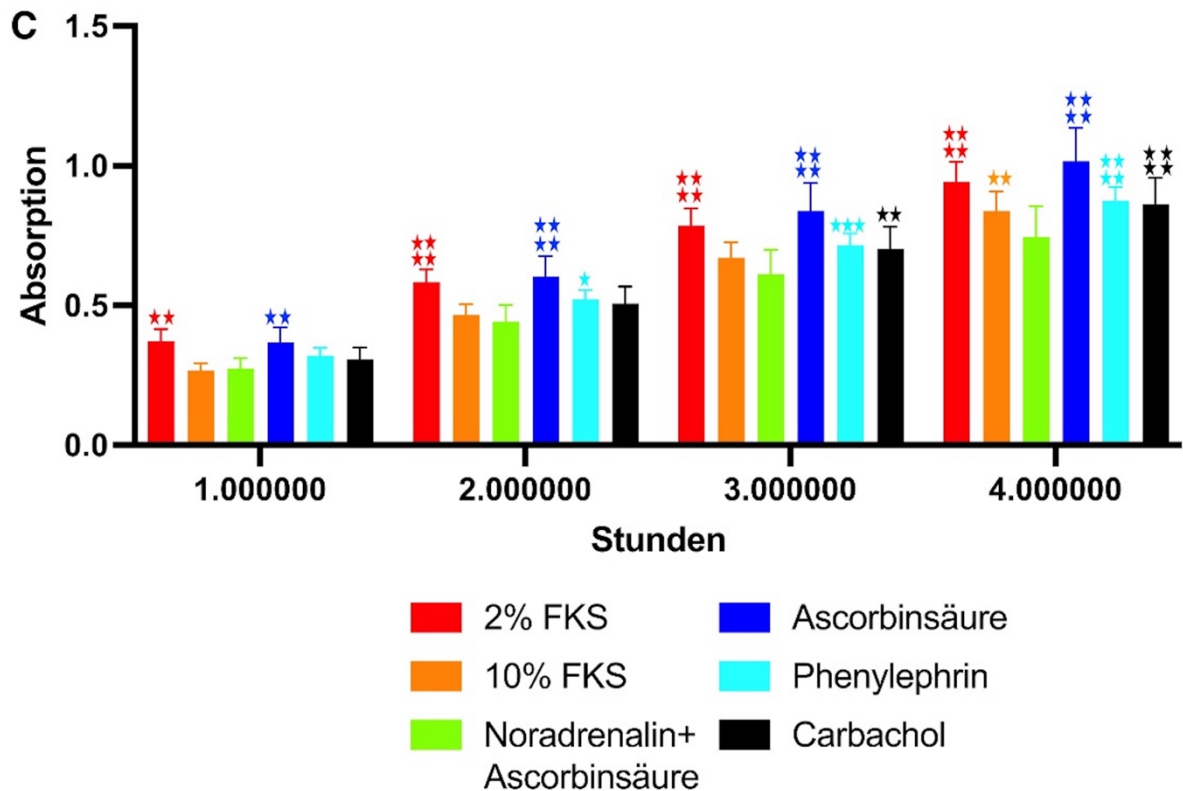


Abbildung 10: Einfluss einer adrenergen sowie cholinergen Stimulation auf die Absorption. Gezeigt sind die Mittelwerte für n=6 sowie der Standardfehler als Fehlerindikator. Jeder Einzelversuch erfolgte unabhängig von den anderen. A zeigt die Absorption graphisch im Verlauf. B und C zeigen die Absorptionen der einzelnen Gruppen zu den jeweiligen Messzeitpunkten. B zeigt signifikante Ergebnisse gegenüber der Negativkontrolle, C beim Vergleich zur mit Noradrenalin und Ascorbinsäure stimulierten Gruppe (* p < 0,05, **p < 0,005, ***p < 0,0005, ****p < 0,0001). 2% FKS = Negativkontrolle = DMEM + 2%FKS, 10% FKS = Positivkontrolle = DMEM + 10%FKS, Noradrenalin und Ascorbinsäure = DMEM + 2%FKS + 10⁻⁶M Noradrenalin + 10⁻⁴M Ascorbinsäure, Ascorbinsäure = DMEM + 2%FKS + 10⁻⁴M Ascorbinsäure, Phenylephrin = DMEM + 2%FKS + 10⁻⁶M Phenylephrin, Carbachol = DMEM + 2%FKS + 10⁻⁶M Carbachol

Es bestand Homogenität der Varianzen, Normalverteilung war für alle Gruppen -mit Ausnahme der mit Noradrenalin und Ascorbinsäure stimulierten Gruppe- gegeben.

Nach vier Stunden zeigen sich signifikante Unterschiede beim Vergleich der Negativkontrolle mit den Gruppen mit Phenylephrin (p = 0,0455), Carbachol (p = 0,0088) sowie Noradrenalin+Ascorbinsäure (p = < 0,0001). Zusätzlich zeigt sich ein hochsignifikanter Unterschied beim Vergleich der nur mit Ascorbinsäure stimulierten Gruppe im Vergleich zur Gruppe mit Noradrenalin und Ascorbinsäure (p = < 0,0001). Auffällig ist zusätzlich, dass die Absorption in der mit Noradrenalin und Ascorbinsäure stimulierten Gruppe auch gegenüber den Gruppen mit Phenylephrin (p = < 0,0001) und Carbachol (p = < 0,0001) klar vermindert war. Im Vergleich zur Positivkontrolle zeigen sich Signifikanzen für die Negativkontrolle (p = 0,0003), die mit Noradrenalin sowie Ascorbinsäure stimulierte Gruppe (p = 0,0017) sowie die Gruppe mit Ascorbinsäure

($p < 0,0001$). Die Gruppen mit Phenylephrin ($p = 0,608$) beziehungsweise Carbachol ($p = 0,913$) waren gegenüber der Positivkontrolle nicht signifikant.

Die Ergebnisse zeigen somit einen negativen Effekt aller drei geprüften Stimulantien auf die Vitalität. Den größten Effekt zeigte hier die Stimulation mit Noradrenalin. Zusätzlich zeigte sich eine signifikante Steigerung der Absorption durch die Ascorbinsäure.

5. Diskussion

In der Zusammenschau aller oben beschriebenen Ergebnisse weist die vorliegende Arbeit auf einen negativen Einfluss adrenerger Stimulation, insbesondere des Noradrenalins auf die Proliferation kornealer Epithelzellen hin. Dieser zeigt sich besonders beim direkten Vergleich der Kurven-/Balkenverläufe zwischen den mit Noradrenalin und Ascorbinsäure stimulierten Zellen auf der einen und den nur mit Noradrenalin stimulierten Zellen auf der anderen Seite (s. Abbildungen fünf und zehn). Auch Phenylephrin zeigte einen hemmenden Effekt auf die Proliferation. Ein entsprechender Einfluss einer adrenergen Stimulation zeigte sich auch in einigen Vorarbeiten (21, 25, 26). Auch eine muskarinerge Stimulation durch Carbachol zeigt in unserer Arbeit einen negativen Effekt auf die Proliferation. Weiterhin fanden wir in unserer Arbeit keine Hinweise auf eine wesentliche Beeinflussbarkeit des Migrationsverhaltens kornealer Epithelzellen durch eine adrenerge oder muskarinerge Stimulation. Dabei ist zu beachten, dass im Rahmen unserer Arbeit keine Verhinderung der Proliferation im Rahmen der Migrationsassays erfolgte (s. Kapitel 5.1) Abgesehen von den adrenergen und muskarinergen Effekten zeigten sich eine Steigerung der Proliferation sowie Hinweise auf eine Hemmung der Migration durch Ascorbinsäure.

5.1. Methodische Einschränkungen

Sämtliche hier durchgeführten Experimente wurden mit einer SV-40 immortalisierten Zelllinie durchgeführt, deren grundlegende Eigenschaften bereits beschrieben wurden (103). Es wurden keine Experimente mit anderen etablierten Zelllinien kornealer Epithelzellen oder entsprechenden Primärzellen durchgeführt, ebenso keine *in vivo* Studien. Die Frage nach der Allgemeingültigkeit, insbesondere nach der Übertragbarkeit auf die *in vivo* herrschenden physiologischen Bedingungen, der vorliegenden Ergebnisse bleibt somit offen. Dies gilt insbesondere vor dem Hintergrund, dass in der Vergangenheit bereits Unterschiede in der Genexpression

zwischen dieser Zelllinie und frischen, humanen Korneaepithelzellen gezeigt werden konnten (109, 110).

Die dieser Arbeit zugrunde liegende Fragestellung war, ob sich durch Substanzen, die die Wirkung des ANS vermitteln, eine Verbesserung der kornealen epithelialen Wundheilung erreichen lässt. In den Experimenten wurden hierfür einzelne Komponenten des komplexen Prozesses der Wundheilung, wie zum Beispiel die Proliferationsfähigkeit, untersucht. Eine Untersuchung der Wundheilung „als Ganzes“ fand nicht statt. Wir entschlossen uns zu dieser Art der Durchführung, um eventuell sichtbare Effekte direkt der entsprechenden Komponente zuordnen zu können. Es konnte in der Vergangenheit bereits gezeigt werden, dass auch die Adhäsion einen wichtigen Schritt der Wundheilung darstellt (42, 43). Dieser Aspekt wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Hierzu sind weitere Studien nötig.

Allen Gruppen -abgesehen von der als Positivkontrolle dienenden Gruppe mit 10% FKS haltigem Vollmedium- wurde stets 2% FKS zugesetzt. Dieser Wachstumsfaktor könnte potenziell zu einer Maskierung tatsächlich vorhandener, jedoch gering ausgeprägter Effekte geführt haben. Wir entschlossen uns dennoch dazu, da die Zellen in mehreren Versuchen eine Kultivierung ohne FKS nicht tolerierten. FKS findet bereits seit den 50er Jahren experimentelle Verwendung, um das Wachstum der jeweiligen Zellen zu steigern (111) und wurde zum Standard für entsprechende Experimente (104, 112). Die Zusammensetzung des FKS hängt jedoch von einer Vielzahl an Faktoren, wie beispielsweise geographischer Herkunft oder Jahreszeit ab und ist somit -bezogen auf die genaue Zusammensetzung- nicht konstant (104, 112-114). Von Monya Baker publizierte Zahlen zeigen beispielsweise für Prolaktin Konzentrationen von 2-49,55 ng/ml, oder für Somatotropin Konzentrationen von 18,7-51,6 ng/ml (113). Auch Infektionen mit Mykoplasmen sind trotz der Verwendung steriler Filter möglich (113). Durch diese sowie eine Reihe weiterer Faktoren kann allein das jeweils genutzte FKS den Ausgang der Experimente beeinflussen (111, 112, 114). Experimente mit alternativen Kulturmedien -zur Evaluation eines potenziellen Einflusses des FKS- wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Hierzu sind weitergehende Untersuchungen erforderlich.

Im Rahmen der Migrationsassays wurde der Verschluss eines künstlich geschaffenen Spaltes analysiert. Dieser Verschluss kann grundsätzlich durch Migration, Proliferation oder eine Kombination beider Prozesse erfolgen. Für einen sicheren Ausschluss von Proliferationseffekten hätte die Zugabe zum Beispiel von Mitosehemmstoffen (wie

Mitomycin C) erfolgen müssen. Diese Substanzen hätten jedoch wiederum selbst einen Einfluss auf das Migrationsverhalten sowie die Vitalität der verwendeten Zellen haben können. Im ersten Schritt entschlossen wir uns daher auf diese zu verzichten. Weitere Untersuchungen mit entsprechendem Ausschluss von Proliferationseffekten sind jedoch notwendig, um die hier beobachteten Effekte auf die Migration genauer zu untersuchen.

Wie bereits beschrieben, wurde allen mit Noradrenalin stimulierten Gruppen auch Ascorbinsäure zugesetzt, um eine Zersetzung weitgehend zu vermeiden (106). Potenziell könnten die bereits beschriebenen Effekte der Ascorbinsäure (47-49), diejenigen des Noradrenalins maskieren.

5.2. Effekte adrenerger Stimulation

Ziel dieser Arbeit war es, weitere Erkenntnisse über den Einfluss des ANS auf die Wundheilung im Epithel der menschlichen Kornea zu gewinnen. Die sympathische Wirkung wird im ANS dabei über adrenerge Rezeptoren und deren Transmitter vermittelt. Als adrenerge Stimulantien wurden Phenylephrin und Noradrenalin untersucht.

Phenylephrin ist ein adrenerger Agonist, der bevorzugt an α_1 -Adrenozeptoren bindet (58) und in dieser Arbeit die Effekte einer solchen Stimulation aufzeigen soll. Phenylephrin bewirkte eine signifikante Abnahme der Proliferation der Zelllinie. 2018 von Musayeva et al. veröffentlichten Daten zeigten bei Gewebeproben von Mäusen keine Veränderung der Proliferation durch das Fehlen jeweils eines α_1 -Adrenozeptorsubtyps. Quantifiziert wurde die Proliferation in der erwähnten Studie mit Hilfe gegen Ki-67 gerichteter Antikörper, um aktiv proliferierende Zellen nachzuweisen (87, 115). Möglicherweise können *in vivo* jedoch die übrigen Subtypen das Fehlen eines einzelnen ausgleichen und so einen Einfluss auf die Proliferation verhindern, während bei einer pharmakologischen Stimulation *in vitro* alle Subtypen stimuliert werden.

Die Migration wurde durch Phenylephrin nicht beeinflusst. Soweit wir wissen, handelt es sich hierbei um die erste Beschreibung der Auswirkungen von Phenylephrin auf die Migration kornealer Epithelzellen.

Zusammenfassend deuten unsere Daten darauf hin, dass die Stimulation des α_1 -Adrenozeptors, bei Zellen des kornealen Epithels *in vitro* eine Reduktion der Proliferation bewirkt und keinen Einfluss auf die Migration hat. Aufgrund der in Kapitel

5.1 bereits dargelegten Einschränkungen, kann dieses Ergebnis nicht ohne Weiteres 1:1 auf die bei Patienten im klinischen Alltag beobachtete Wundheilung übertragen werden, bestätigt jedoch bereits gewonnene Erkenntnisse (87). Für Phenylephrin enthaltende Augentropfen sind zwar erhöhte Resorptionsraten bei Defekten im Korneaepithel beschrieben (58), ob der hemmende Effekt auf die Proliferation jedoch beim Menschen besteht und klinisch relevant ist, kann nach derzeitigem Stand nicht beantwortet werden.

Im Unterschied zum bevorzugt an α_1 -Adrenozeptoren bindenden Phenylephrin, bindet Noradrenalin auch gut an β -Adrenozeptoren und soll in der vorliegenden Arbeit, in Abgrenzung zu den Experimenten mit Phenylephrin, insbesondere die Effekte einer β -adrenergen Stimulation auf die kornealen Epithelzellen sichtbar machen. In den vorliegenden Daten zeigte sich eine signifikante Hemmung der Proliferation durch die Hinzugabe von Noradrenalin. Besonders deutlich wird dieser Effekt beim Vergleich der mit Ascorbinsäure stimulierten Zellen mit der Gruppe, die Ascorbinsäure und Noradrenalin erhielt. Die Ergebnisse des Proliferationsassays wurden im MTS-Assay in der Tendenz bestätigt. Die Migration wurde dagegen nicht beeinflusst. Ein negativer Einfluss einer β -adrenergen Stimulation auf die Wundheilung wurde in der Literatur mehrfach beschrieben (21, 25, 26).

Beispielsweise untersuchten Pullar et al. den Einfluss des β -Agonisten Isoproterenol auf frisch kultivierte Zellen von Spenderhornhäuten. Der Einfluss auf das Proliferationsverhalten wurde über einen Zeitraum von acht Tagen untersucht, ein signifikanter Effekt wurde jedoch, unabhängig von der Konzentration des Isoproterenols, nicht festgestellt. Dafür wurde die Migrationsrate einzelner Zellen gesenkt. Die Wundheilung als Ganzes wurde anhand von Rinderhornhäuten untersucht, auch hier fand sich ein negativer Effekt von Isoproterenol (25). Im Unterschied zu unseren Daten fanden sich also ein negativer Effekt auf die Migration und keine Hinweise auf eine negative Beeinflussung der Proliferation. Andere Experimente mit Isoproterenol bestätigten –bei Vorhandensein eines β_2 -Adrenozeptors- eine verlangsamte Migration von kornealen Epithelzellen der Maus, sowie *in vivo* bei Mäusen eine langsamere korneale Wundheilung (21).

Im lebenden Organismus vermittelt der Sympathikus seine Wirkung an den Endorganen jedoch nicht über Isoproterenol, sondern über Noradrenalin. Eine Arbeit von Xue et al. untersuchte den Einfluss des Sympathikus auf die korneale

Wundheilung bei Mäusen *in vivo*. Dabei wurde gezeigt, dass eine erhöhte Aktivität des Sympathikus zu einer langsameren Reepithelialisierung und verlangsamten Zellteilung führt. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass diese Effekte durch -im Rahmen der gesteigerten Sympathikusaktivität vermehrt ausgeschüttete- Katecholamine ausgelöst werden, vermittelt durch β -Adrenozeptoren (26). Diese Ergebnisse passen zu denen dieser Arbeit.

Wie bereits beschrieben, ist die Literaturlage jedoch widersprüchlich. Murphy et al. fanden 1998 einen positiven Einfluss von Noradrenalin auf Migration und Proliferation (23). Diese Arbeit wurde mit der gleichen Zelllinie durchgeführt, die auch in unseren aktuellen Versuchen benutzt wurde (103). Murphy et al. beschreiben einen positiven Einfluss von Noradrenalin auf das Proliferationsverhalten kornealer Epithelzellen, am stärksten für eine Konzentration von 750 nM. Ein hemmender Effekt trat in dieser Studie erst bei 100 μ M, also 10^{-4} M auf, in unserer Arbeit bereits für die gewählte Konzentration von 10^{-6} M. Im Unterschied zu unseren Experimenten wurden die Zellen bei Murphy et al. nach dem Aussähen nicht nur für 24, sondern für 48 Stunden in Vollmedium mit 10% FKS inkubiert. Danach erfolgten nochmal 48 Stunden im Inkubator mit 0,5% FKS enthaltendem Medium und erst anschließend die Stimulation (23). Insbesondere in der doppelt so langen Zeit in Vollmedium könnte ein Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Ergebnisse liegen, da das FKS die Proliferation verstärkt (111, 112). Keine Erklärung bietet die jeweils genutzte Konzentration des Noradrenalins, da in der Studie von Murphy et al. auch für eine Konzentration von 10^{-6} M eine signifikante Steigerung der Proliferation beobachtet wurde. Auch Murphy et al. nutzten Ascorbinsäure, um einer Zersetzung von Noradrenalin vorzubeugen. Im Unterschied zu unserer Arbeit gab es jedoch keine Kontrollgruppe, der lediglich Ascorbinsäure -jedoch kein Noradrenalin- zugegeben wurde. Berücksichtigt man neuere Erkenntnisse, die einen positiven Effekt von Ascorbinsäure auf die Wundheilung sowie Zellproliferation im kornealen Epithel zeigen (47-49), erscheint es möglich, dass die von Murphy et al. dem Noradrenalin zugeschriebenen Effekte, eigentlich durch die Ascorbinsäure verursacht wurden. Auch unsere Ergebnisse zeigen in Übereinstimmung mit der Literaturlage eine signifikante Steigerung der Proliferation durch Ascorbinsäure. Einschränkend ist zu sagen, dass Murphy et al. mit 10^{-7} M eine deutlich niedrigere Konzentration von Ascorbinsäure verwendeten als wir mit 10^{-4} M. Hierdurch könnten die Effekte der Ascorbinsäure in unseren Experimenten stärker ausgeprägt sein.

Einen weiteren Ansatzpunkt für die Erklärung unterschiedlichen Resultate liefern die im vorherigen Kapitel beschriebenen Einschränkungen, die mit der Verwendung von FKS einhergehen. Ein anderer Erklärungsansatz liegt in der verwendeten Zelllinie selbst. Yamasaki et al. konnten zeigen, dass die hier verwendete Zelllinie nicht als homogene Zellpopulation vorliegt, sondern dass sich verschiedene Subpopulationen bilden, welche sich in ihren jeweiligen Eigenschaften – beispielsweise Morphologie und Wachstumsverhalten- unterscheiden, sowie genetisch differieren können (109, 110). Daher könnten sich die von uns verwendeten Zellen von denen die Murphy et al. nutzten durchaus entsprechend unterscheiden und zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

Zusammenfassend stehen unsere Daten im Widerspruch zu denen von Murphy et al. (23), sind mit neueren Publikationen jedoch durchaus vereinbar (26) und zeigen einen negativen Einfluss einer adrenergen Stimulation -die im lebenden Organismus durch den Sympathikus vermittelt werden kann- auf das Proliferationsverhalten kornealer Epithelzellen. Die Migration wurde in unserer Arbeit durch eine adrenerge Stimulation nicht signifikant beeinflusst, soweit ohne den Ausschluss von Proliferationseffekten beurteilbar. Für ein genaueres Bild, insbesondere zur weiteren Differenzierung der Rollen einer α - beziehungsweise einer β -adrenergen Stimulation, sind jedoch weitere Studien notwendig.

5.3. Effekte cholinergischer Stimulation

Neben der sympathischen, verfügt das ANS auch über eine parasympathische Wirkkomponente. Letztere vermittelt ihren Einfluss durch cholinerge, muskarinerge Rezeptoren. Um den Einfluss dieser Komponente zu untersuchen, wurde der cholinerge Agonist Carbachol genutzt.

Soweit uns bekannt, ist die vorliegende Arbeit die Erste, die über einen längeren Zeitraum gezielt den Einfluss einer cholinergen Stimulation auf die Proliferationsfähigkeit kornealer Epithelzellen *in vitro* untersucht. Chernyavsky et al. verglichen zwar durch die Zugabe von Trypanblau den Anteil vitaler Zellen mit und ohne Zugabe von Carbachol nach maximal 72 Stunden, eine systematische Untersuchung des Proliferationsverhaltens fand jedoch nicht statt (27). Unsere Ergebnisse zeigen somit nach unserem Wissen erstmals den negativen Einfluss der cholinergen Stimulation mit Carbachol auf die Proliferation kornealer Epithelzellen *in*

vitro. Im MTS-Assay zeigte sich ebenfalls ein negativer Einfluss durch Gabe von Carbachol.

Verschiedene vergangene *in vivo* Experimente zeigten keinen Einfluss von Pilocarpin auf die korneale Wundheilung sowie die Zellteilung im Epithel (26, 30). Es existieren allerdings auch Arbeiten, die einen positiven Effekt cholinergischer Stimulation mittels Carbachol sowie Pilocarpin auf die Wundheilung *in vivo* fanden (28). In letztgenannter Arbeit wurde jedoch nicht differenziert, welcher Teilaspekt der Wundheilung durch die entsprechenden Substanzen positiv beeinflusst wurde und Carbachol zeigte schwächere Effekte als die anderen beiden Cholinergika.

Unsere Daten zeigen keine Beeinflussung des Migrationsverhaltens kornealer Epithelzellen durch eine Stimulation mit Carbachol. Dies steht in Widerspruch zu einer Arbeit von Chernyavsky et al., die *in vitro* einen positiven Einfluss cholinergischer Stimulation mittels Carbachol auf Reepithelialisierung, Migration und Adhäsion an immortalisierten humanen Epithelzellen (116) der Kornea zeigten (27).

Bei genauerer Betrachtung der letztgenannten Studie von Chernyavsky et al. fallen einige Unterschiede in der Methodik auf, die Hinweise für die Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse liefern könnten. Beispielsweise wurde in dieser Arbeit eine andere Zelllinie verwendet, die sich unter anderem in ihrer genetischen Ausstattung sowie ihren Wachstumseigenschaften von der in unserer Arbeit verwendeten Zelllinie unterscheidet (116). Bei Betrachtung der Scratch Assays fällt auf, dass -im Gegensatz zu unserer Arbeit-, für die ersten Stunden Proliferationshemmer hinzugegeben wurden. Es wäre denkbar, dass potentielle, leichte Effekte von Carbachol auf das Migrationsverhalten in unseren Versuchen durch parallel ablaufende Zellproliferation -und den negativen Einfluss des Carbachols hierauf- überdeckt wurden. Die weiteren von Chernyavsky et al. durchgeführten Versuche zur Evaluation der Migration decken einen Zeitraum von 10 Tagen ab (27). Eine Untersuchung vergleichbarer Langzeiteffekte bei der Untersuchung der Migration fand in unserer Arbeit nicht statt, die Migrationsassays deckten hier einen Zeitraum von 24 Stunden, gerechnet ab dem Zeitpunkt der Stimulation, ab. Eine längerfristige Beobachtung der Effekte war in dem durch uns gewählten Versuchsdesign nicht möglich, da (wie die oben angeführten Ergebnisse zeigen) nach dieser Zeit in den meisten Fällen der beobachtete Spalt bereits vollständig verschlossen war. Eine Reduzierung der initial ausgesäten Zellzahl zur Verlängerung des Versuchsprotokolls war nicht erfolgreich, da die hierzu notwendige Reduktion der Zellzahl zu einem

weitgehenden Absterben der ausgesäten Zellen führte. Es ist somit möglich, dass ein vergleichbarer, langfristig ausgerichteter Untersuchungsansatz auch mit der von uns verwendeten Zelllinie zu ähnlichen Ergebnissen führen könnte. Auch die Effekte von Carbachol auf die Proliferation zeigten sich in unserer Arbeit erst nach einigen Tagen. Dies müsste in weiterführenden Studien untersucht werden.

Eine weitere Erklärung für die gegensätzlichen Ergebnisse könnte in der von uns gewählten Konzentration des Carbachols (10^{-6} M) liegen. Sloniecka et al. konnten für Keratozyten des kornealen Stromas eine Steigerung der Proliferation durch Acetylcholin zeigen, für Konzentrationen von 10^{-7} M und 10^{-8} M. Eine Konzentration von 10^{-6} M zeigte jedoch keinen Effekt (105). Bekannt ist, dass cholinerge Rezeptoren als Folge einer dauerhaften Stimulation runterreguliert werden können (117, 118), was einen möglichen Erklärungsansatz darstellt, warum höhere Konzentrationen keinen proliferationsfördernden Effekt zeigten. Sloniecka et al. nutzen in der erwähnten Arbeit jedoch Acetylcholin, nicht Carbachol und die Versuche fanden mit Zellen des kornealen Stromas, nicht mit solchen des Epithels statt. Chernyavsky et al. selbst nutzten sogar höhere Dosierungen an Carbachol (5×10^{-5} M) als wir und fanden trotzdem einen fördernden Effekt von Carbachol auf die Migration (27). Auch Arbeiten, die den Einfluss einer Stimulation mit Carbachol auf das Proliferationsverhalten konjunktivaler Epithelzellen oder weiterer humaner Zelllinien untersuchten, nutzten höhere Konzentrationen zwischen 10^{-3} und 10^{-6} M (17, 119). Da für die speziell von uns verwendete Zelllinie nach unserem Wissen noch keine Daten zu einer Stimulation mit Carbachol vorlagen, wählten wir mit 10^{-6} M eine mittlere Konzentration im Vergleich zur vorliegenden Literatur. Im Vergleich zur Arbeit von Chernyavsky et al. bleibt jedoch möglich, dass die unterschiedlichen Zelllinien sich in ihrer Toleranz gegenüber Carbachol unterscheiden und höhere oder niedrigere Konzentrationen, bei der von uns verwendeten Zelllinie, die Proliferation und/oder Migration steigern würden, wie für andere Zellen beschrieben (105). Auch hierin liegt ein interessanter Ansatzpunkt für zukünftige Arbeiten.

Zusammenfassend zeigen unsere Daten einen negativen Einfluss von Carbachol auf die Proliferation, bei fehlendem Einfluss auf die Migration kornealer Epithelzellen soweit in dem gewählten Versuchsdesign zu beurteilen. Die Datenlage in der Literatur ist widersprüchlich (26-28, 30), weiterführende Studien sind hier notwendig.

5.4. Ausblick

Wie bereits in der Einleitung der vorliegenden Arbeit dargelegt, haben ein besseres Verständnis der kornealen Wundheilung, der Beeinflussbarkeit dieser durch unser vegetatives Nervensystem sowie eine folgende Optimierung der therapeutischen Möglichkeiten eine hohe klinische sowie gesundheitsökonomische Bedeutung. Unsere Arbeit leistet hierzu einen Beitrag. Wir konnten zeigen, dass eine adrenerge Stimulation kornealer Epithelzellen das Proliferationsverhalten signifikant hemmt. Der fehlende Einfluss einer α_1 -adrenergen Stimulation auf die Migration wird nach unserem Wissen in dieser Arbeit erstmalig gezeigt. Einen interessanten Ansatzpunkt zur Untersuchung des Effekts des Phenylephrins für ergänzende Arbeiten liefern Daten von Zhao et al. Hier wurden verschiedenen zytotoxische und proapoptotische Effekte -beispielsweise abnorme Zellmorphologien- für Zellen des kornealen Stromas, ausgelöst durch eine Stimulation mit Phenylephrin, nachgewiesen (120). Ob sich solche Effekte durch Phenylephrin auch im kornealen Epithel nachweisen lassen, stellt eine interessante Fragestellung mit hoher klinischer Relevanz für zukünftige Untersuchungen dar.

Unsere Daten zeigen, dass eine Stimulation mit Noradrenalin das Proliferationsverhalten kornealer Epithelzellen hochsignifikant negativ beeinflusst. Hierzu passt auch die vergleichsweise geringe Absorption im MTS-Assay, die auch gegenüber den anderen Stimulantien signifikant gesenkt war. Es stellt sich die Frage, durch welche Rezeptoren genau dieser vermittelt wird. Hierzu sollten weitere *in vitro* Experimente durchgeführt werden, in denen -in verschiedenen Gruppen- jeweils α - beziehungsweise β -Adrenozeptoren selektiv geblockt werden um herauszufinden, ob sich die durch Phenylephrin beziehungsweise Noradrenalin induzierten Veränderungen auf diese Weise aufheben lassen. Der nächste Schritt bestünde dann im Versuch, entsprechende Effekte auch *in vivo* nachzuweisen.

Nach unseren Informationen ist dies die erste Arbeit, die *in vitro* einen negativen Einfluss einer cholinergen Stimulation auf das Proliferationsverhalten kornealer Epithelzellen zeigt. Eine im Bereich kornealer Stromazellen bereits beschriebene Dosisabhängigkeit der Effekte durch entsprechende Stimulation (105), auf Zellen des kornealen Epithels zu übertragen und auszuschließen wäre ein weiterer sinnvoller Ansatz für zukünftige Arbeiten. Die Abhängigkeit des Effektes von der verwendeten Dosis sollte auch für die adrenergen Stimulantien ergänzend untersucht werden.

Bezüglich der Beeinflussung des Migrationsverhaltens durch cholinerge Stimulation widersprechen unsere Ergebnisse den in der Literatur vorliegenden Daten (27). Es sollten entsprechende langfristig angelegte Assays durchgeführt werden, um auszuschließen, dass die unterschiedlichen Ergebnisse lediglich auf einem verschieden langen Untersuchungszeitraum beruhen. Ergänzt werden sollte dies um Experimente, bei denen die Migration unter Zugabe von Proliferationshemmern untersucht wird, um eine Maskierung vorhandener, eventuell geringer Effekte auszuschließen.

Letztlich weisen die von uns erhobenen Daten auf eine negative Beeinflussbarkeit des Proliferationsverhaltens kornealer Epithelzellen durch eine adrenerge Stimulation insbesondere von β -Adrenozeptoren sowie von muskarinergen Rezeptoren hin. Der negative Effekt einer cholinergen Stimulation auf die Proliferation, konnten nach unserem Wissen dabei durch uns erstmalig gezeigt werden. Die vorliegende Arbeit hat somit einige interessante Ansatzpunkte für zukünftige Untersuchungen geliefert, um weitere Forschung in dieser Richtung zu betreiben.

6. Zusammenfassung

Die physiologisch transparente Kornea stellt die vorderste Begrenzung des menschlichen Auges dar. Ihre äußerste Schicht wird durch das korneale Epithel gebildet (2, 38). Das Epithel unterliegt einem kontinuierlichen Regenerationsprozess, durch den die Zellzahl unter physiologischen Bedingungen konstant bleibt (39-41). Kommt es zu Schädigungen der Kornea werden unter anderem Migration und Proliferation von Stammzellen im Bereich des Limbus gesteigert, um eine Defektheilung zu erreichen (42, 43).

Im klinischen Alltag spielen Schäden des kornealen Epithels eine große Rolle (3, 4, 7, 10-13). Entsprechend ist auch das Interesse an der Erforschung von Methoden zur Verbesserung der Wundheilung in diesem Bereich hoch (14, 15, 45-54, 57).

Es ist bekannt, dass die Wundheilung durch das ANS beeinflusst werden kann (77). Das ANS vermittelt seine Wirkung durch adrenerge beziehungsweise muskarinergen Stimulation. Die Existenz entsprechender Rezeptoren an der menschlichen Kornea wurde bereits nachgewiesen (16-20). Der Einfluss einer entsprechenden Stimulation auf die Wundheilung wird jedoch für beide Rezeptorgruppen in der Literatur unterschiedlich beurteilt (21-31). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss einer

adrenergen sowie muskarinergen Stimulation auf die Proliferation und Migration kornealer Epithelzellen genauer zu untersuchen.

Zu diesem Zweck erfolgten verschiedene Versuchsreihen. Der Effekt von Carbachol (Agonist an muskarinergen Rezeptoren) sowie der adrenergen Agonisten Phenylephrin und Noradrenalin auf die Proliferation kornealer Epithelzellen *in vitro* wurde über sieben Tage untersucht. Dabei zeigten alle der getesteten Stimulantien einen hemmenden Effekt. Das ebenfalls durchgeführte MTS-Assay bestätigt diesen Effekt. Im Vergleich der drei Stimulantien im MTS-Assay, war der Effekt für Noradrenalin am stärksten ausgeprägt.

Der hemmende Einfluss einer adrenergen, insbesondere einer β -adrenergen Stimulation auf die Proliferation passt zu mehreren Vorarbeiten (26), widerspricht jedoch einer Arbeit von Murphy et al. (23). Eine Möglichkeit dafür liegt darin, dass in der Arbeit von Murphy et al. der proliferationsfördernde Einfluss der Ascorbinsäure nicht berücksichtigt wurde (23, 47-49). Auch unsere Arbeit zeigte eine Steigerung der Proliferation durch Ascorbinsäure.

Der ebenfalls hemmende Einfluss einer dauerhaften muskarinergen Stimulation auf die Proliferation wird in dieser Arbeit nach unserem Wissen erstmals gezeigt. Er widerspricht vorangegangenen *in vivo* Experimenten, die einen positiven Einfluss von Cholinergika auf die korneale Wundheilung zeigten, ohne jedoch die einzelnen Aspekte der Wundheilung getrennt zu analysieren (28).

Neben der Proliferation, stellt die Migration von Zellen einen entscheidenden Teilprozess der Wundheilung dar. Daher erfolgten ergänzend Versuche, in denen der Verschluss eines künstlich geschaffenen Spaltes über 24 Stunden beobachtet wurde. Keines der verwendeten Stimulantien zeigte in unserer Arbeit einen Effekt auf die Migration. Bei der Interpretation ist zwingend zu berücksichtigen, dass im Rahmen der Migrationsassays auf die Verwendung von Proliferationshemmern verzichtet wurde. Insbesondere kleinere Effekte könnten so möglicherweise maskiert worden sein. Chernyavsky et al. fanden durch Hinzugabe von Proliferationshemmern einen positiven Einfluss cholinergischer Stimulation auf die Migration, bei einem allerdings über 10 Tage angelegten Versuchsdesign (27). Möglicherweise hat der hemmende Einfluss des Carbachols auf die Proliferation in unserer Arbeit fördernde Einflüsse auf die Migration maskiert. Gleiches gilt für den fehlenden Einfluss der adrenergen Stimulation in den entsprechenden Versuchsreihen.

Zusammenfassend konnten wir einen negativen Einfluss adrenerger sowie muskarinerger Stimulation auf das Proliferationsverhalten kornealer Epithelzellen zeigen. Besonders ausgeprägt war der hemmende Effekt für Noradrenalin. Zur genaueren Differenzierung, zum Beispiel zur Frage über welche Rezeptorsubtypen die Effekte vermittelt werden, sind weitere Studien nötig. Gleiches gilt für die Analyse der Auswirkungen auf die Migration.

7. Literaturverzeichnis

1. Bergua A. Cornea. Das menschliche Auge in Zahlen. 1. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer 2017. p. 53-9.
2. Grehn F. Hornhaut. Augenheilkunde. 32. Auflage, Springer Verlag; 2019. p. 141-88.
3. Owens P, Mutter R. Emergency department visits related to eye injuries, 2008: statistical brief 112. 2011 Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56035/?report=printable>. Letzter Zugriff: 12.01.2020
4. Channa R, Zafar SN, Canner JK, Haring RS, Schneider EB, Friedman DS. Epidemiology of Eye-Related Emergency Department Visits. JAMA Ophthalmology. 2016;134(3):312-9.
5. Statistisches Bundesamt. Statistisches Jahrbuch 2019. 2019.
6. Heidemann C, Kuhnert R, Born S, Scheidt-Nave C. 12-Monats-Prävalenz des bekannten Diabetes mellitus in Deutschland. Journal of Health Monitoring. 2017;2(1):48-56.
7. Schultz RO, Van Horn DL, Peters MA, Klewin KM, Schutt WH. Diabetic Keratopathy. Transactions of the American Ophthalmological Society. 1981;79:180-99.
8. Dua H, Said DG, Messmer EM, Rolando M, Benitez-Del-Castillo JM, Hossain PN, et al. Neurotrophic keratopathy. Progress in retinal and eye research. 2018;66:107-31.
9. Messmer EM. [Clinical picture and diagnosis of neurotrophic keratopathy]. Ophthalmologe. 2019;116(2):120-6.
10. Stanisic S, Marocco A, Gallo A, Rama P, Sacchetti M, Rolando M, et al. Epidemiology and economic impact of moderate and severe neurotrophic keratopathy in Italy. Global & Regional Health Technology Assessment: Italian; Northern Europe and Spanish. 2018;2018.
11. NaPier E, Camacho M, McDevitt TF, Sweeney AR. Neurotrophic keratopathy: current challenges and future prospects. Ann Med. 2022;54(1):666-73.
12. Koay SY, Larkin DFP. New Pharmacological Approaches for the Treatment of Neurotrophic Keratitis. Front Pharmacol. 2022;13:796854.
13. Bu JB, Gericke A, Pfeiffer N, Wasielica-Poslednik J. Neurotrophic keratopathy: Clinical presentation and effects of cenegermin. Am J Ophthalmol Case Rep. 2022;26:101488.
14. Rieck PW, Pleyer U. [Corneal wound healing. II. Treatment of disorders of wound healing]. Ophthalmologe. 2003;100(12):1109-30.
15. Meller D, Pauklin M, Thomasen H, Westekemper H, Steuhl KP. Amniotic membrane transplantation in the human eye. Dtsch Arztebl Int. 2011;108(14):243-8.
16. Grueb M, Reinthal E, Rohrbach JM, Bartz-Schmidt KU. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in human corneal epithelium and endothelium. Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology. 2006;244(9):1191-5.

17. Liu S, Li J, Tan DT, Beuerman RW. Expression and function of muscarinic receptor subtypes on human cornea and conjunctiva. *Investigative ophthalmology & visual science* 2007;48(7):2987-96.
18. Grueb M, Wallenfels-Thilo B, Denk O, Mielke J, Reinthal E, Rohrbach JM, et al. Monoamine receptors in human corneal epithelium and endothelium. *Acta Ophthalmol Scand.* 2006;84(1):110-5.
19. Kahle G, Kaulen P, Wollensak J. Quantitative autoradiography of beta-adrenergic receptors in rabbit eyes. *Exp Eye Res.* 1990;51:503-7.
20. Walkenbach RJ, Ye G-S, Reinach PS, Boney F. Alpha 1Adrenoceptors in Human Corneal Epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science* 1991;32(12):3067-72.
21. Ghoghawala SY, Mannis MJ, Pullar CE, Rosenblatt MI, Isseroff RR. Beta2-adrenergic receptor signaling mediates corneal epithelial wound repair. *Investigative ophthalmology & visual science* 2008;49(5):1857-63.
22. Liu GS, Trope GE, Basu PK. Beta Adrenoceptors and Regenerating Corneal Epithelium. *Journal of ocular pharmacology.* 1990;6:101-12.
23. Murphy CJ, Campbell S, Araki-Sasaki K, Marfurt CF. Effect of norepinephrine on proliferation, migration, and adhesion of SV-40 transformed human corneal epithelial cells. *Cornea.* 1998;17(5):529-36.
24. Nork TM, Holly FJ, Hayes J, Wentlandt T, Lamberts DW. Timolol inhibits corneal epithelial wound healing in rabbits and monkeys. *Archives of ophthalmology.* 1984;102:1224-8.
25. Pullar CE, Zhao M, Song B, Pu J, Reid B, Ghoghawala S, et al. Beta-adrenergic receptor agonists delay while antagonists accelerate epithelial wound healing: evidence of an endogenous adrenergic network within the corneal epithelium. *J Cell Physiol.* 2007;211(1):261-72.
26. Xue Y, He J, Xiao C, Guo Y, Fu T, Liu J, et al. The mouse autonomic nervous system modulates inflammation and epithelial renewal after corneal abrasion through the activation of distinct local macrophages. *Mucosal Immunol.* 2018;11(5):1496-511.
27. Chernyavsky AI, Galitovskiy V, Shchepotin IB, Jester JV, Grando SA. The acetylcholine signaling network of corneal epithelium and its role in regulation of random and directional migration of corneal epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 2014;55(10):6921-33.
28. Er H. The effect of topical parasympathomimetics on corneal epithelial healing in rabbits. *Documenta ophthalmologica.* 1997;93:327-35.
29. Öztürk F, Kurt E, Inan ÜÜ, Emiroglu L, Ilker SS. The effects of acetylcholine and propolis extract on corneal epithelial wound healing in rats. *Cornea.* 1999;18(4):466-71.
30. Robin JB, Kash RL, Azen SP, Schanzlin DJ. Lack of effect of pilocarpine on corneal epithelial wound healing. *Curr Eye Res.* 1984;3(3):403-6.
31. Tian CL, Wen Q, Fan TJ. Cytotoxicity of atropine to human corneal epithelial cells by inducing cell cycle arrest and mitochondrion-dependent apoptosis. *Exp Toxicol Pathol.* 2015;67(10):517-24.
32. Baumeister M, Kohnen T. *Anatomie des Augenvorderabschnitts.* Refraktive Chirurgie. Berlin, Heidelberg: Springer; 2011. p. 11-24.

33. Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology*. 2013;120(9):1778-85.
34. Dua HS, Said DG. Clinical evidence of the pre-Descemet's layer (Dua's layer) in corneal pathology. *Eye (Lond)*. 2016;30(8):1144-5.
35. McKee HD, Irion LC, Carley FM, Brahma AK, Jafarinasab MR, Rahmati-Kamel M, et al. Re: Dua et al.: Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet layer (Dua's layer) (*Ophthalmology* 2013;120:1778-85). *Ophthalmology*. 2014;121(5):e24-5.
36. Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Author reply: To PMID 23714320. *Ophthalmology*. 2014;121(5):e25-6.
37. Gray H. *Anatomy of the human body*: Lea & Febiger; 20. Auflage, 1918.
38. Werkmeister RM, Sapeta S, Schmidl D, Garhofer G, Schmidinger G, Aranha Dos Santos V, et al. Ultrahigh-resolution OCT imaging of the human cornea. *Biomed Opt Express*. 2017;8(2):1221-39.
39. Di Girolamo N, Bobba S, Raviraj V, Delic NC, Slapetova I, Nicovich PR, et al. Tracing the fate of limbal epithelial progenitor cells in the murine cornea. *Stem Cells*. 2015;33(1):157-69.
40. Amitai-Lange A, Altshuler A, Bublej J, Dbayat N, Tiosano B, Shalom-Feuerstein R. Lineage tracing of stem and progenitor cells of the murine corneal epithelium. *Stem Cells*. 2015;33(1):230-9.
41. Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z Hypothesis of Corneal Epithelial Maintenance. *Investigative ophthalmology & visual science* 1983;24:1442-3.
42. Ljubimov AV, Saghizadeh M. Progress in corneal wound healing. *Progress in retinal and eye research*. 2015;49:17-45.
43. Dua H, Gomes JAP, Singh A. Corneal epithelial wound healing. *British Journal of Ophthalmology*. 1994;78:401-8.
44. Gericke A, Wasielica-Poslednik J, Zimmermann M, Musayeva A. [Expansion and Transplantation of Limbal Stem Cells for Corneal Surface Regeneration]. *Klin Monbl Augenheilkd*. 2019;236(6):777-83.
45. Crooke A, Guzman-Aranguiz A, Mediero A, Alarma-Estrany P, Carracedo G, Pelaez T, et al. Effect of melatonin and analogues on corneal wound healing: involvement of Mt2 melatonin receptor. *Curr Eye Res*. 2015;40(1):56-65.
46. Wittmann J, Dieckow J, Schroder H, Hampel U, Garreis F, Jacobi C, et al. Plasma gelsolin promotes re-epithelialization. *Sci Rep*. 2018;8(1):13140.
47. Chen J, Lan J, Liu D, Backman LJ, Zhang W, Zhou Q, et al. Ascorbic Acid Promotes the Stemness of Corneal Epithelial Stem/Progenitor Cells and Accelerates Epithelial Wound Healing in the Cornea. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(5):1356-65.
48. Gujral GS, Askari SN, Ahmad S, Zakir SM, Saluja K. Topical vitamin C, vitamin E, and acetylcysteine as corneal wound healing agents: A comparative study. *Indian J Ophthalmol*. 2020;68(12):2935-9.
49. Li M, Chen Z, Liu L, Ma X, Zou J. Topical Vitamin C Promotes the Recovery of Corneal Alkali Burns in Mice. *J Ophthalmol*. 2021;2021:2406646.
50. Jetton JA, Ding K, Kim Y, Stone DU. Effects of Tobacco Smoking on Human Corneal Wound Healing. *Cornea*. 2014;33:453-6.

51. Saghizadeh M, Kramerov AA, Yu FS, Castro MG, Ljubimov AV. Normalization of wound healing and diabetic markers in organ cultured human diabetic corneas by adenoviral delivery of c-Met gene. *Investigative ophthalmology & visual science* 2010;51(4):1970-80.
52. Saghizadeh M, Epifantseva I, Hemmati DM, Ghiam CA, Brunken WJ, Ljubimov AV. Enhanced wound healing, kinase and stem cell marker expression in diabetic organ-cultured human corneas upon MMP-10 and cathepsin F gene silencing. *Investigative ophthalmology & visual science* 2013;54(13):8172-80.
53. Hattori M, Shimizu K, Katsumura K, Oku H, Sano Y, Matsumoto K, et al. Effects of all-trans retinoic acid nanoparticles on corneal epithelial wound healing. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*. 2012;250(4):557-63.
54. Saghizadeh M, Dib CM, Brunken WJ, Ljubimov AV. Normalization of wound healing and stem cell marker patterns in organ-cultured human diabetic corneas by gene therapy of limbal cells. *Exp Eye Res*. 2014;129:66-73.
55. Tsai RJ-F, Li L-M, Chen J-K. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *The New England Journal of Medicine*. 2000;343:86-93.
56. Riedl JC, Musayeva A, Wasielica-Poslednik J, Pfeiffer N, Gericke A. Allogenic simple limbal epithelial transplantation (alloSLET) from cadaveric donor eyes in patients with persistent corneal epithelial defects. *Br J Ophthalmol*. 2021;105(2):180-5.
57. Azmi MF, Abd Ghafar N, Che Hamzah J, Chua KH, Ng SL. The role of Gelam honey in accelerating reepithelialization of ex vivo corneal abrasion model. *J Food Biochem*. 2021;45(4):e13645.
58. Ursapharm. Fachinformation Neosynephrin-POS® 5 %. 2016. Verfügbar unter: https://dxsat.ursapharm.de/mediaportal/live/_storage/asset/96130/storage/master/download/2016_01_Neosynephrin-POS%205%20_.pdf. Letzter Zugriff: 16.01.2024
59. Stavert B, McGuinness MB, Harper CA, Guymer RH, Finger RP. Cardiovascular Adverse Effects of Phenylephrine Eyedrops: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Ophthalmology*. 2015;133(6):647-52.
60. Intensivmedizin DGfAu, Geburtshilfe DGfGu, (Hrsg.). Die geburtshilfliche Analgesie und Anästhesie. S1-Leitlinie. AWMF-Register-Nr: 001-038. 2020.
61. von Euler U. Synthese, Speicherung und Freisetzung des adrenergischen Neurotransmitters. *Klinische Wochenschrift*. 1971;49:524-9.
62. Sanofi. Fachinformation Arterenol® 1ml/25ml. 2020. Verfügbar unter: <https://www.rote-liste.de/suche/praep/2601-0/Arterenol%C2%AE%201%20ml%2F-25%C2%A0ml%20Injektionsl%C3%B6sung>. Letzter Zugriff: 14.01.2024
63. Kreislaufforschung DGfK-H-u. S3 Leitlinie Infarktbedingter kardiogener Schock - Diagnose, Monitoring, Therapie. AWMF-Leitlinien-Register Nr 019/013. 2019.
64. Schmidt PDH. *Pharmakologie und Toxikologie: für Studium und Praxis*. Stuttgart: Schattauer 2007.
65. Goyal RK. Muscarinic receptor subtypes: Physiology and clinical implications. *The New England Journal of Medicine*. 1989;321(15):1022-9.
66. Lohse MJ. Ophthalmika. In: Schwabe U, Ludwig W-D, editors. *Arzneiverordnungs-Report Berlin, Heidelberg*: Springer; 2020. p. 733-58.

67. Leitliniengruppe DeVHfd. S3-Leitlinie Schizophrenie (Langfassung). AWMF-Register Nr 038-009. 2019;Version 1.0, zuletzt geändert am 15. März 2019:116.
68. Schiebler TH, Korf H-W. Anatomie. 10. Auflage. Dresden: Steinkopff Verlag; 2007.
69. Marfurt CF, Kingsley RE, Echtenkamp SE. Sensory and Sympathetic Innervation of the Mammalian Cornea: A retrograde tracing study. *Investigative ophthalmology & visual science* 1989;30:461-72.
70. Marfurt CF, Ellis LC. Immunohistochemical Localization of Tyrosine Hydroxylase in Corneal Nerves. *The Journal of comparative neurology*. 1993;336:517-31.
71. Toivanen M, Tervo T, Partanen M, Vannas A, Hervonen A. Histochemical Demonstration of Adrenergic Nerves in the Stroma of Human Cornea. *Investigative ophthalmology & visual science* 1987:398-400.
72. Ehringer B. A Comparative Study of the Adrenergic Nerves to the Anterior Eye Segment of Some Primates. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*. 1971;116(2):157-77.
73. Müller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TMT. Corneal nerves: structure, contents and function. *Experimental Eye Research*. 2003;76(5):521-42.
74. McDougal DH, Gamlin PD. Autonomic control of the eye. *Compr Physiol*. 2015;5(1):439-73.
75. Sweeney DF, Vannas A, Holden BA, Tervo T, Telaranta T. Evidence for sympathetic neural influence on human corneal epithelial function. 1985.
76. Marfurt CF, Jones MA, Thrasher K. Parasympathetic Innervation of the Rat Cornea. *Exp Eye Res*. 1998;66:437-48.
77. Jurjus A, Hourani R, Daouk H, Youssef L, Bou-Khali P, Haidar H, et al. Effect of denervation on burn wound healing. *Annals of Burns and Fire Disasters*. 2018;31(4):278-91.
78. Ahlquist RP. A Study of the Adrenotropic Receptors. *Am J Physiol*. 1948;153(3):586-600.
79. Latek D, Modzelewska A, Trzaskowski B, Palczewski K, Filipek S. G protein-coupled receptors — recent advances. 2012;59(4):515-29.
80. Katritch V, Cherezov V, Stevens RC. Diversity and modularity of G protein-coupled receptor structures. *Trends Pharmacol Sci*. 2012;33(1):17-27.
81. Gilsbach R, Preissl S, Hein L. [α -Adrenoceptors: three subtypes for a broad spectrum of activity]. *Pharm Unserer Zeit*. 2011;40(6):462-8.
82. Pierce KL, Lefkowitz RJ. Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-Protein-coupled receptors. 2001;2:727-33.
83. Hieble JP, Bylund DB, Clarke DE, Eikenburg DC, Langer SZ, Lefkowitz RJ, et al. International Union of Pharmacology X. Recommendation for Nomenclature of α 1-Adrenoceptors: Consensus Update. *Pharmacological Reviews*. 1995;47.
84. Docherty JR. Subtypes of functional α 1-adrenoceptor. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(3):405-17.
85. Marti D, Miquel R, Ziani K, Gisbert R, Ivorra MD, Anselmi E, et al. Correlation between mRNA levels and functional role of α 1-adrenoceptor subtypes in arteries:

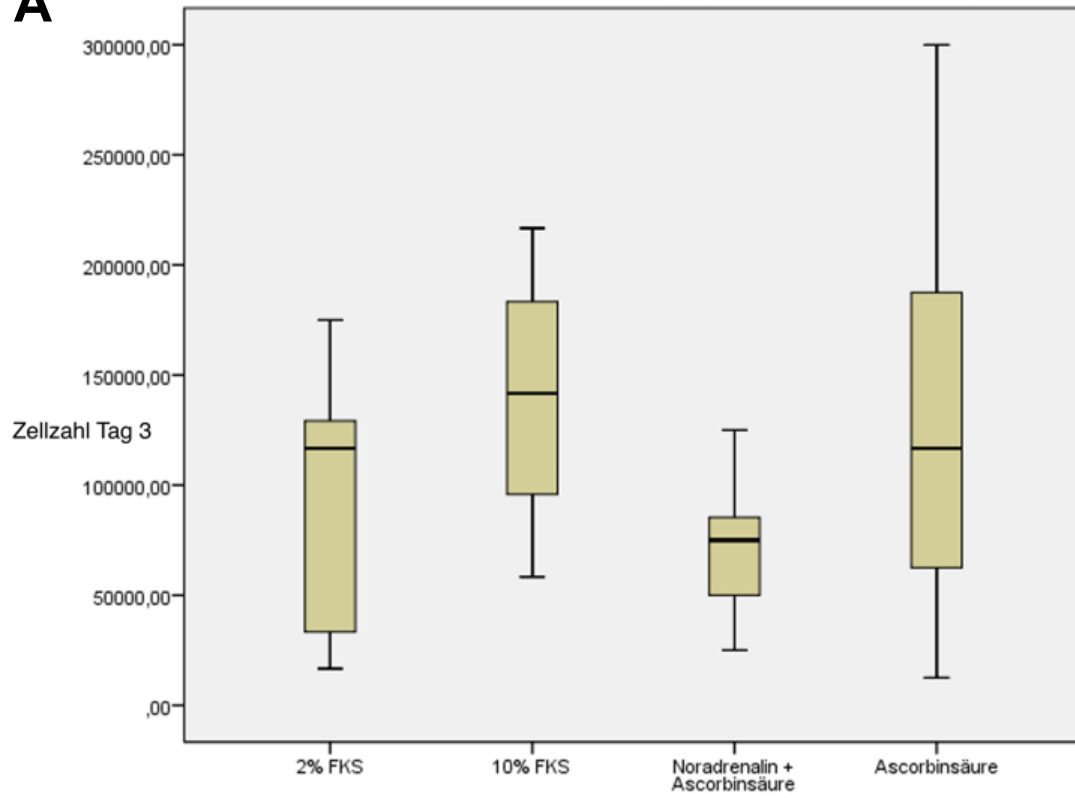
- evidence of alpha1L as a functional isoform of the alpha1A-adrenoceptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(5):H1923-32.
86. Majesky MW, Daemen MJ, Schwartz SM. Alpha 1-adrenergic stimulation of platelet-derived growth factor A-chain gene expression in rat aorta. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265(2):1082-8.
87. Musayeva A, Manicam C, Steege A, Brochhausen C, Straub BK, Bell K, et al. Role of α 1-Adrenoceptor Subtypes on Corneal Epithelial Thickness and Cell Proliferation in Mice. *American journal of physiology Cell physiology*. 2018;315(5):C757-C65.
88. Granneman JG. The putative beta4-adrenergic receptor is a novel state of the beta1-adrenergic receptor. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2001;280(2):E199-E202.
89. Galaz-Montoya M, Wright SJ, Rodriguez GJ, Lichtarge O, Wensel TG. beta2-Adrenergic receptor activation mobilizes intracellular calcium via a non-canonical cAMP-independent signaling pathway. *J Biol Chem*. 2017;292(24):9967-74.
90. Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, Madabushi S, et al. beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J Biol Chem*. 2006;281(2):1261-73.
91. Kim IM, Tilley DG, Chen J, Salazar NC, Whalen EJ, Violin JD, et al. Beta-blockers alprenolol and carvedilol stimulate beta-arrestin-mediated EGFR transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(38):14555-60.
92. Elena P-P, Denis P, Kosina-Boix M, Saraux H, Lapalus P. Beta Adrenergic Binding Sites in the Human Eye: An Autoradiographic Study. *Journal of ocular pharmacology*. 1990;6(2):143-9.
93. Walkenbach RJ, Gibbs SR, Bylund DB, Chao W-TH. Characteristics of beta-adrenergic receptors in bovine corneal epithelium: comparison of fresh tissue and cultured cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1984;121(2):664-72.
94. Gesek FA. alpha2-adrenergic receptors activate phospholipase c in renal epithelial cells. *Molecular Pharmacology*. 1996;50:407-14.
95. DM P. α 1-Adrenergic Receptors in Neurotransmission, Synaptic Plasticity, and Cognition. *Front Pharmacol* 2020;11.
96. Fan D, Fan TJ. Clonidine Induces Apoptosis of Human Corneal Epithelial Cells through Death Receptors-Mediated, Mitochondria-Dependent Signaling Pathway. *Toxicol Sci*. 2017;156(1):252-60.
97. Saarinen-Savolainen P, Järvinen T, Araki-Sasaki K, Watanabe H, Urtti A. Evaluation of Cytotoxicity of Various Ophthalmic Drugs, Eye Drop Excipients and Cyclodextrins in an Immortalized Human corneal Epithelial Cell Line. *Pharmaceutical Research*. 1998;15(8):1275-80.
98. Caulfield MP, Birdsall NJM. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Pharmacological Reviews*. 1998;50(2):279-90.
99. Grub M, Mielke J, Rohrbach JM. [m4 muscarinic receptors of the cornea : muscarinic cholinceptor-stimulated inhibition of the cAMP-PKA pathway in corneal epithelial and endothelial cells]. *Ophthalmologe*. 2011;108(7):651-7.

100. Olsen JS, Neufeld AH. The rabbit cornea lacks cholinergic receptors. *Investigative ophthalmology & visual science* 1979;18(12):1216-25.
101. Walkenbach RJ, Ye G-S. Muscarinic cholinergic regulation of cyclic guanosine monophosphate in human corneal epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science* 1991;32(3).
102. Chernyavsky AI, Galitovskiy V, Grando SA. Molecular mechanisms of synergy of corneal muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in upregulation of E-cadherin expression. *Int Immunopharmacol.* 2015;29(1):15-20.
103. Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, Hayashi K, Watanabe H, Tano Y, et al. An SV40-Immortalized Human Corneal Epithelial Cell Line and Its Characterization. *Investigative ophthalmology & visual science* 1996;36(3):614-21.
104. Gstraunthaler G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: Serum-free cell culture. *ALTEX.* 2003;20(4):275-81.
105. Sloniecka M, Backman LJ, Danielson P. Acetylcholine enhances keratocyte proliferation through muscarinic receptor activation. *Int Immunopharmacol.* 2015;29(1):57-62.
106. Roskoski JR R, Gahn LG, Roskoski LM. Inactivation of phosphorylated rat tyrosine hydroxylase by ascorbate in vitro. *European Journal of Biochemistry.* 1993;218:363-70.
107. Ibidi GmbH. Application Note 21. Wound Healing Assay With the ibidi Culture-Insert 2 Well in a μ -Dish 35 mm. Version 2.0. In: GmbH i, editor. 2018. Verfügbar unter: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwji8vXWouKDAxW5RvEDHb54AdoQFnoECA8QAQ&url=https%3A%2F%2Fibidi.com%2Fimg%2Fcms%2Fsupport%2FAN%2FAN21_Wound_Healing_Assay.pdf&usg=AOvVaw12QBriXI81wHAMH8-R3VfV&opi=89978449. Letzter Zugriff: 21.11.2020
108. Promega Corporation. CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay [press release]. 2012. Verfügbar unter: https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol.pdf?rev=d82fc3dda1554b26b9c253acae903164&sc_lang=en. Letzter Zugriff: 12.08.2023
109. Yamasaki K, Kawasaki S, Young RD, Fukuoka H, Tanioka H, Nakatsukasa M, et al. Genomic aberrations and cellular heterogeneity in SV40-immortalized human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(2):604-13.
110. Greco D, Vellonen K-S, Turner HC, Häkli M, Tervo T, Auvinen P, et al. Gene expression analysis in SV-40 immortalized human corneal epithelial cells cultured with an air-liquid interface. *Molecular Vision.* 2010;16:2109-20.
111. Puck TD, Cieciura SJ, Robinson A. Genetics Of Somatic mammalian Cells. III. Long-Term Cultivation of Euploid Cells from Human And Animal Subjects. 1958:945-58.
112. van der Valk J, Bieback K, Buta C, Cochrane B, Dirks WG, Fu J, et al. Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. *ALTEX.* 2018;35(1):99-118.
113. Baker M. Reproducibility: Respect Your Cells! *Nature.* 2016;537:433-5.

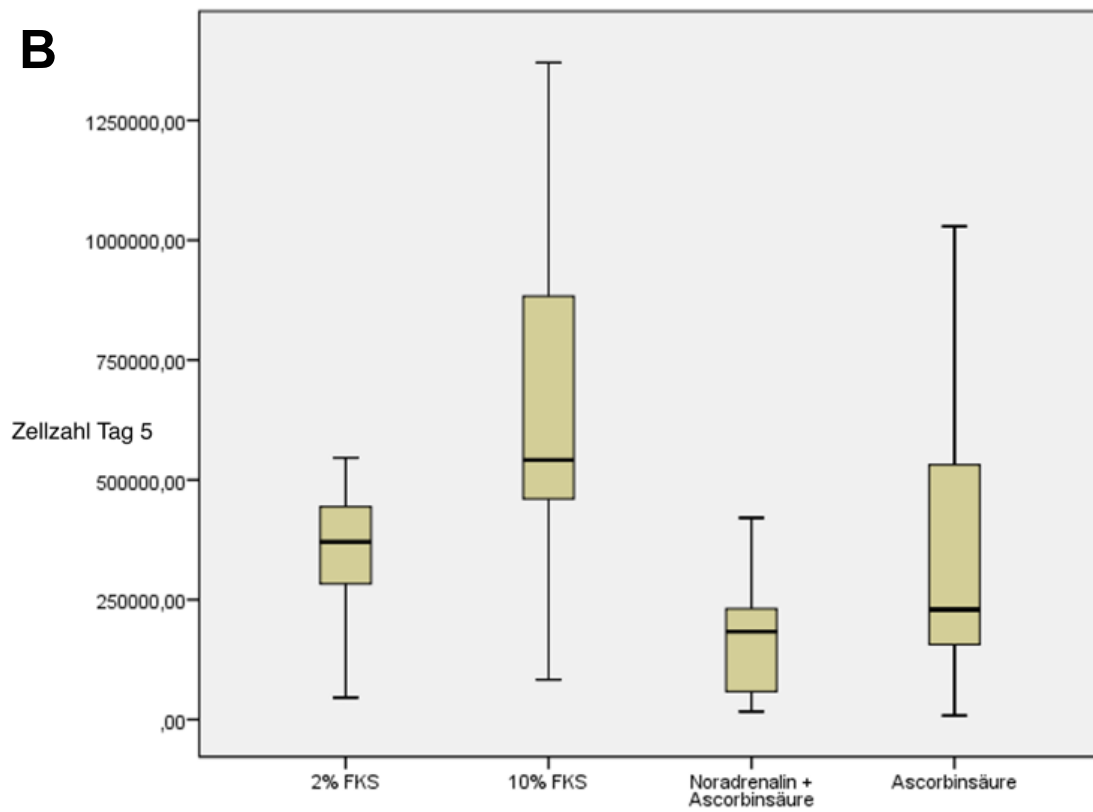
114. Tekkotte C, Gunasingh GP, Cherian KM, Sankaranarayanan K. "Humanized" stem cell culture techniques: the animal serum controversy. *Stem Cells Int.* 2011;2011:504723.
115. Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology.* 2002;40:2-11.
116. Robertson DM, Li L, Fisher S, Pearce VP, Shay JW, Wright WE, et al. Characterization of growth and differentiation in a telomerase-immortalized human corneal epithelial cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(2):470-8.
117. Li B, Duysen EG, Volpicelli-Daley LA, Levey AI, Lockridge O. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor function in acetylcholinesterase knockout mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 2003;74(4):977-86.
118. Quick MW, Lester RA. Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J Neurobiol.* 2002;53(4):457-78.
119. Arrighi N, Bodei S, Lucente A, Michel MC, Zani D, Simeone C, et al. Muscarinic receptors stimulate cell proliferation in the human urothelium-derived cell line UROtsa. *Pharmacol Res.* 2011;64(4):420-5.
120. Zhao J, Qiu Y, Tian CL, Fan TJ. The cytotoxic and pro-apoptotic effects of phenylephrine on corneal stromal cells via a mitochondrion-dependent pathway both in vitro and in vivo. *Exp Toxicol Pathol.* 2016;68(7):409-17.

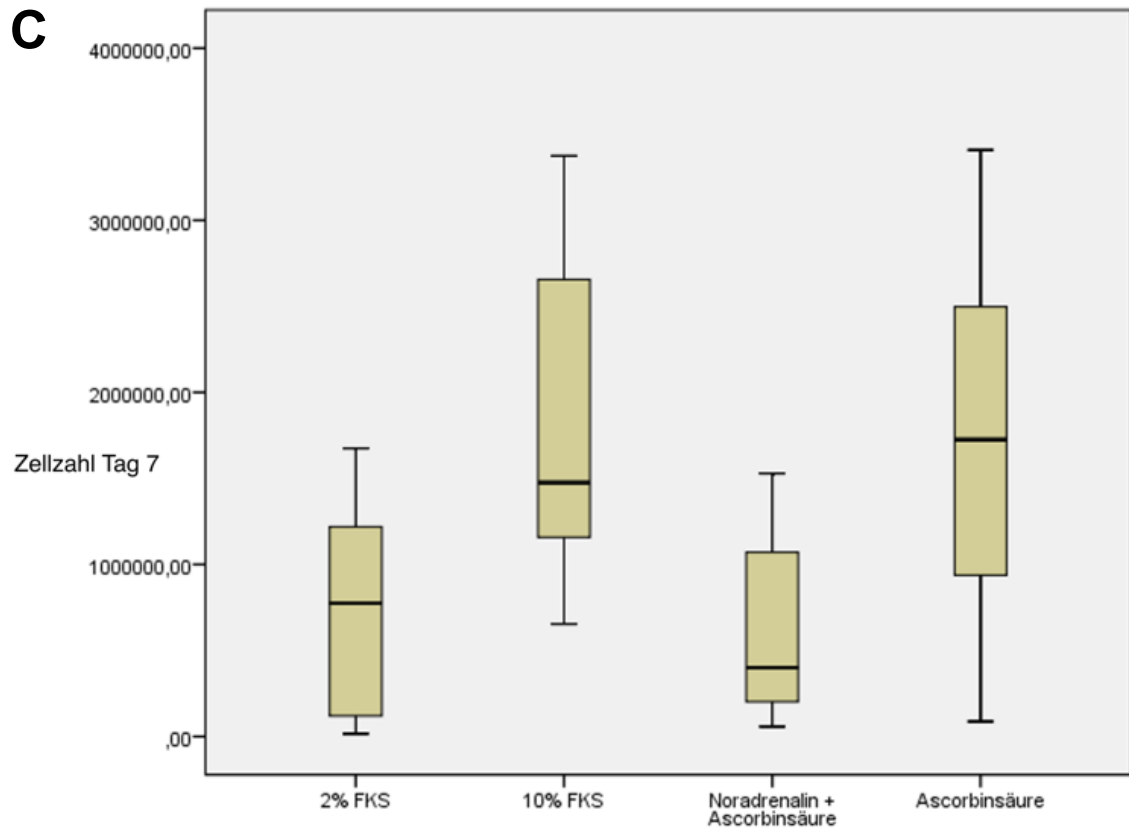
Anhang

A

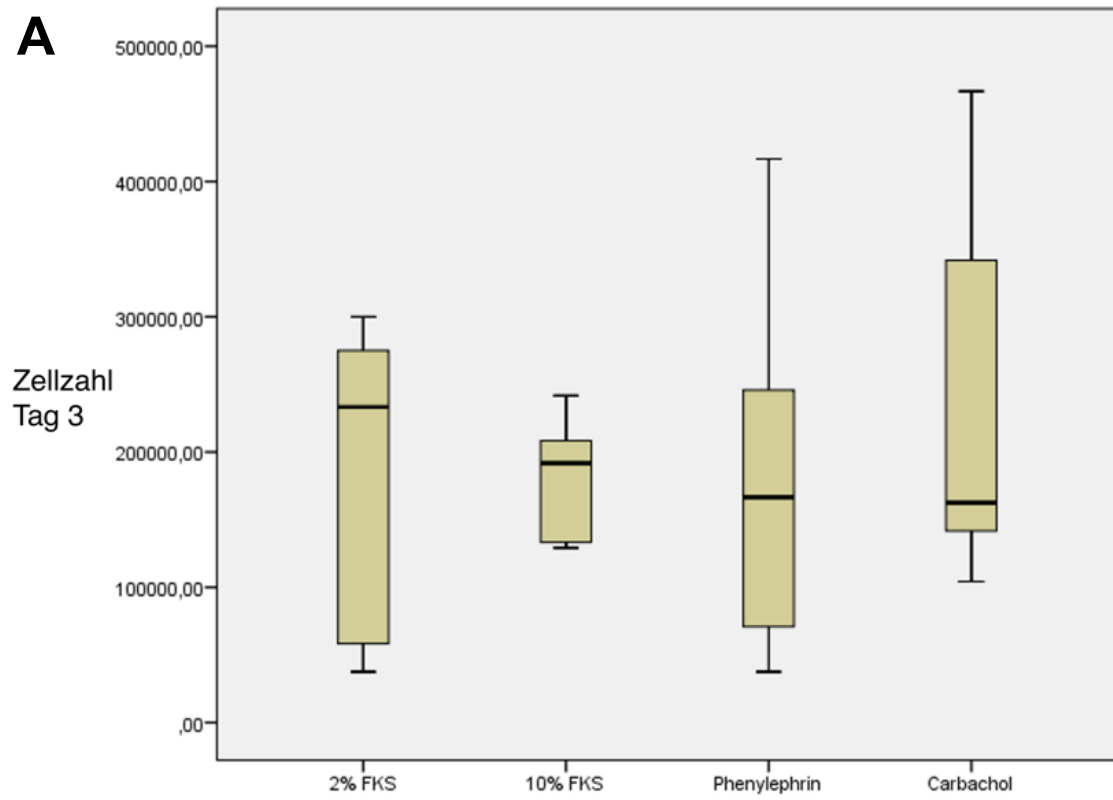
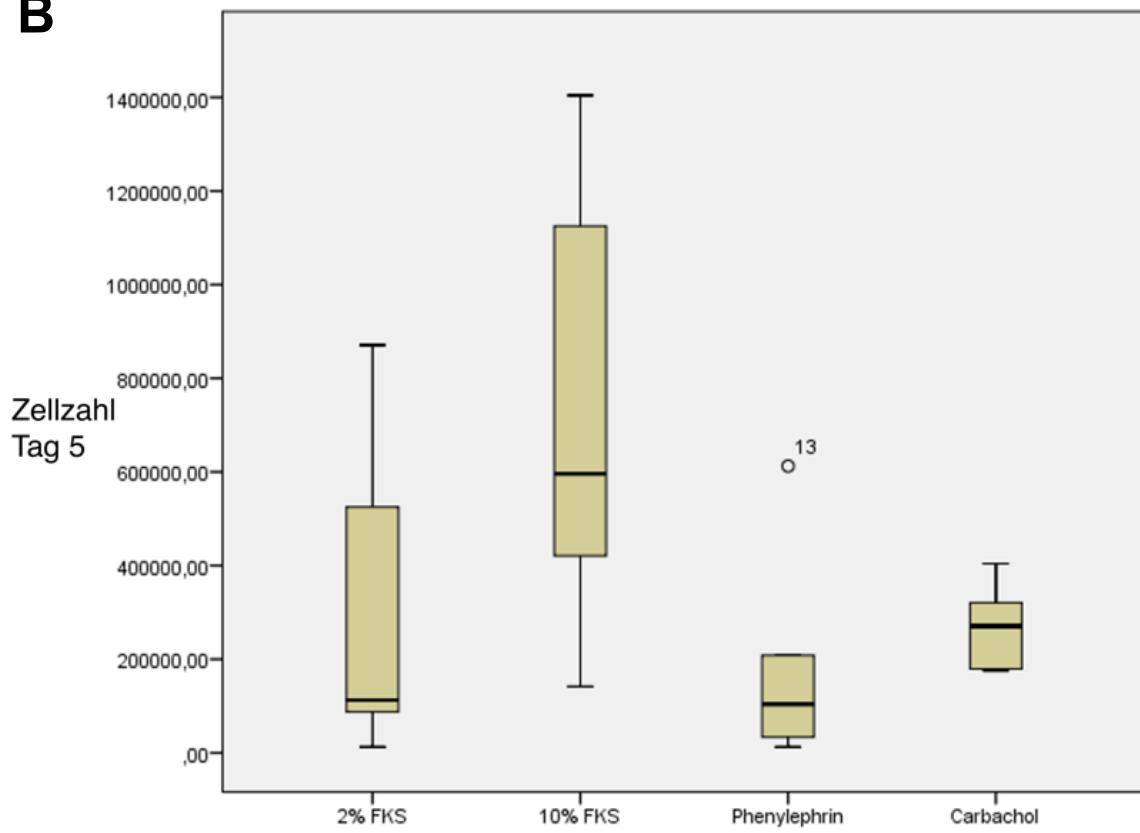


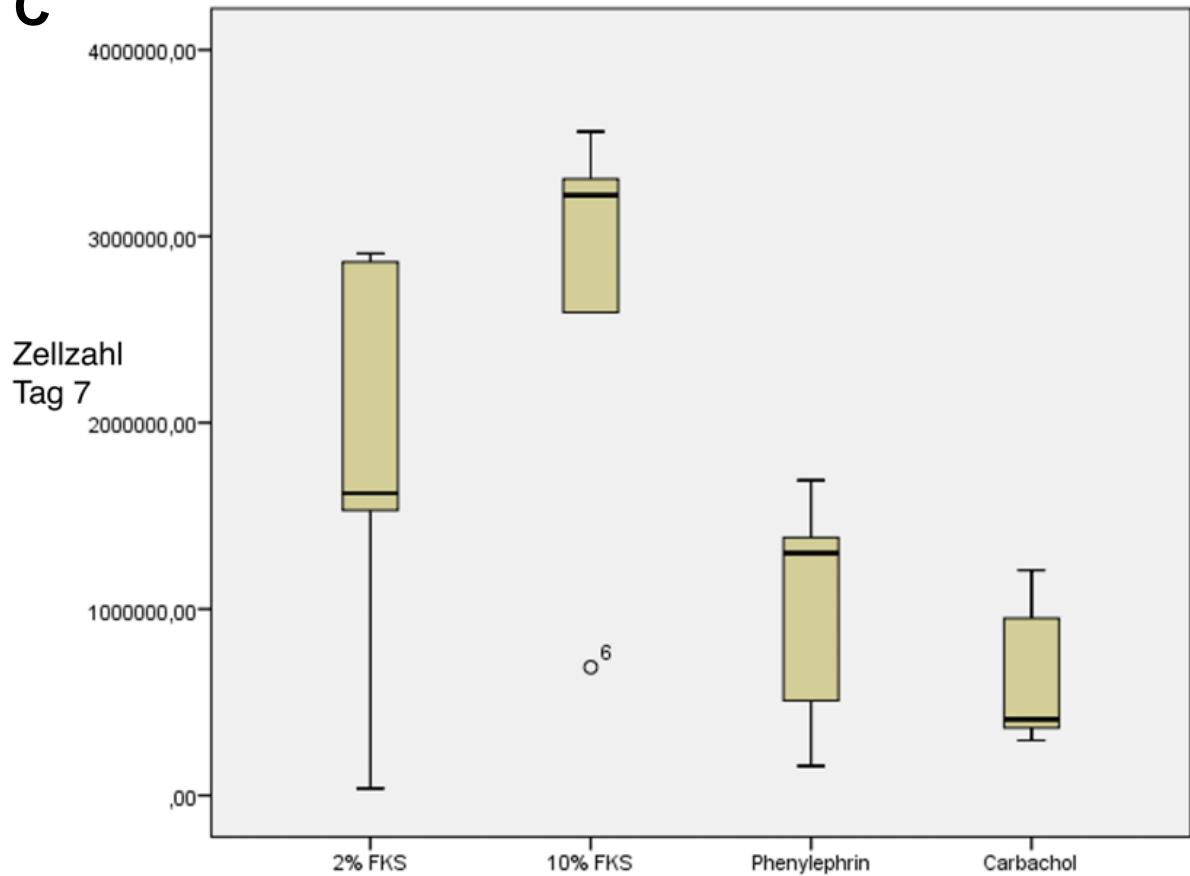
B



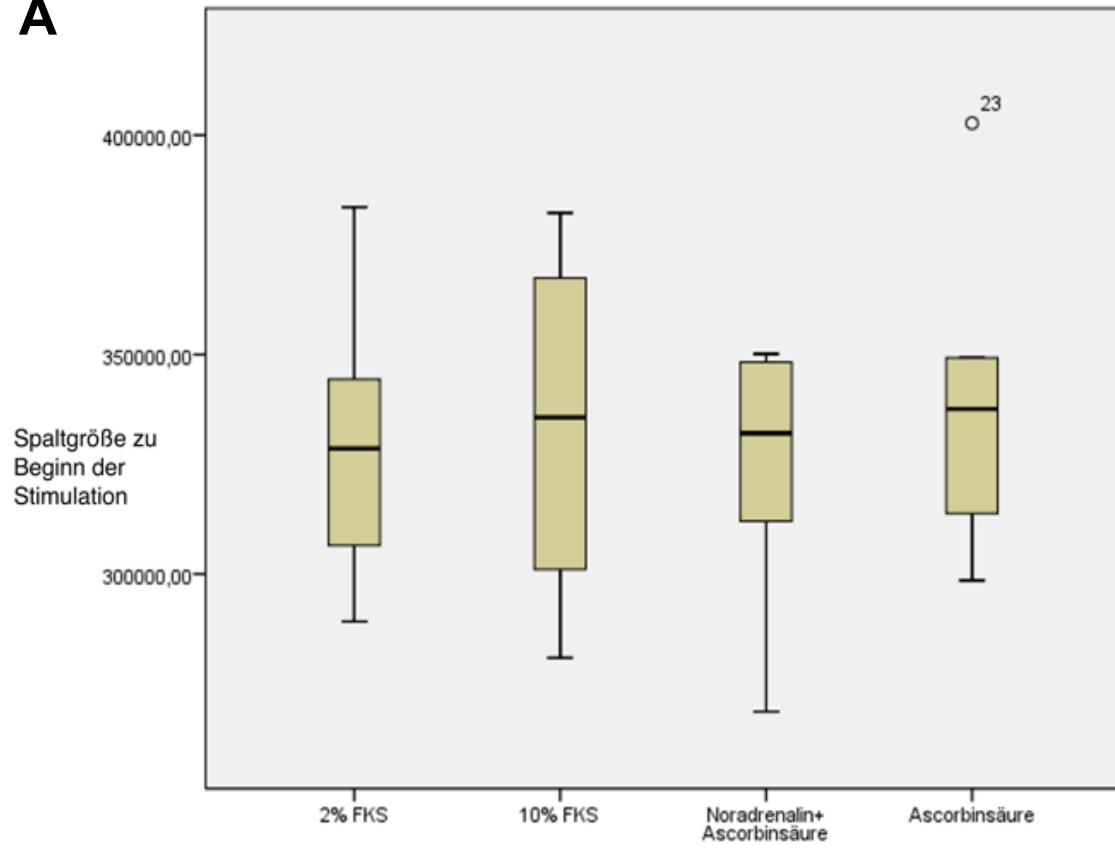
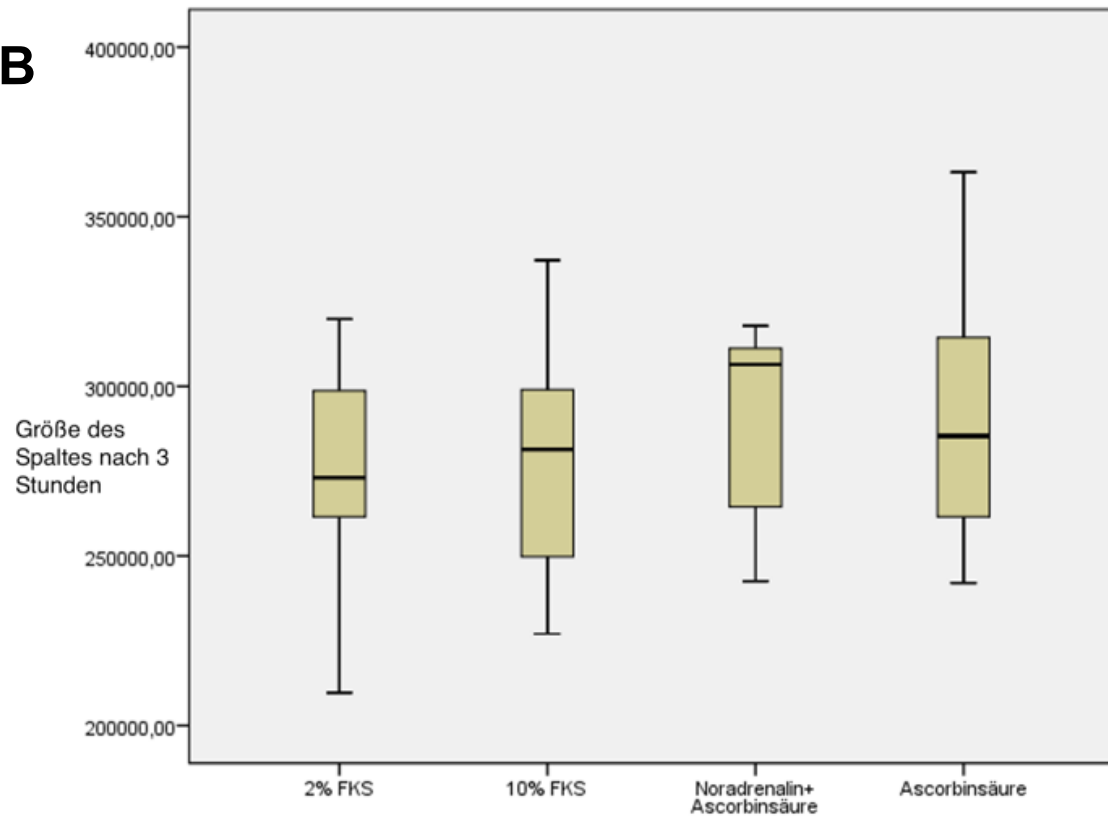


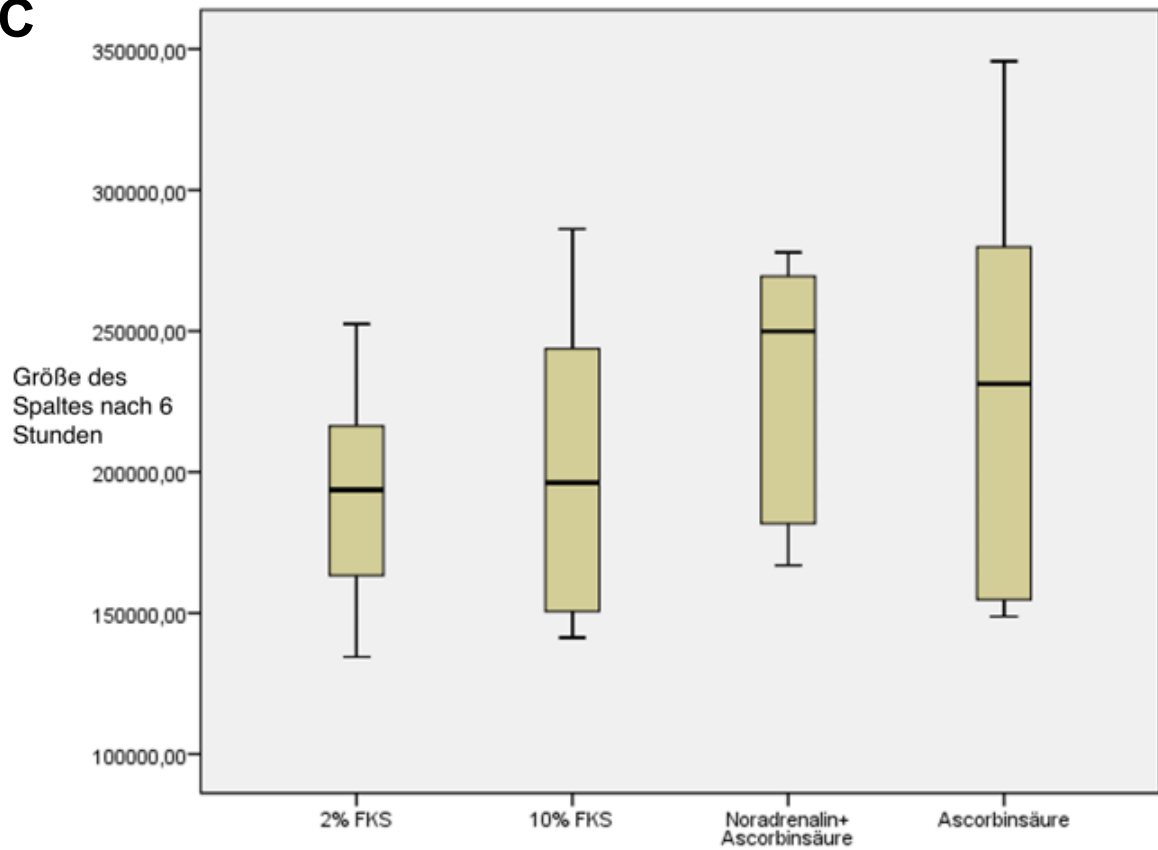
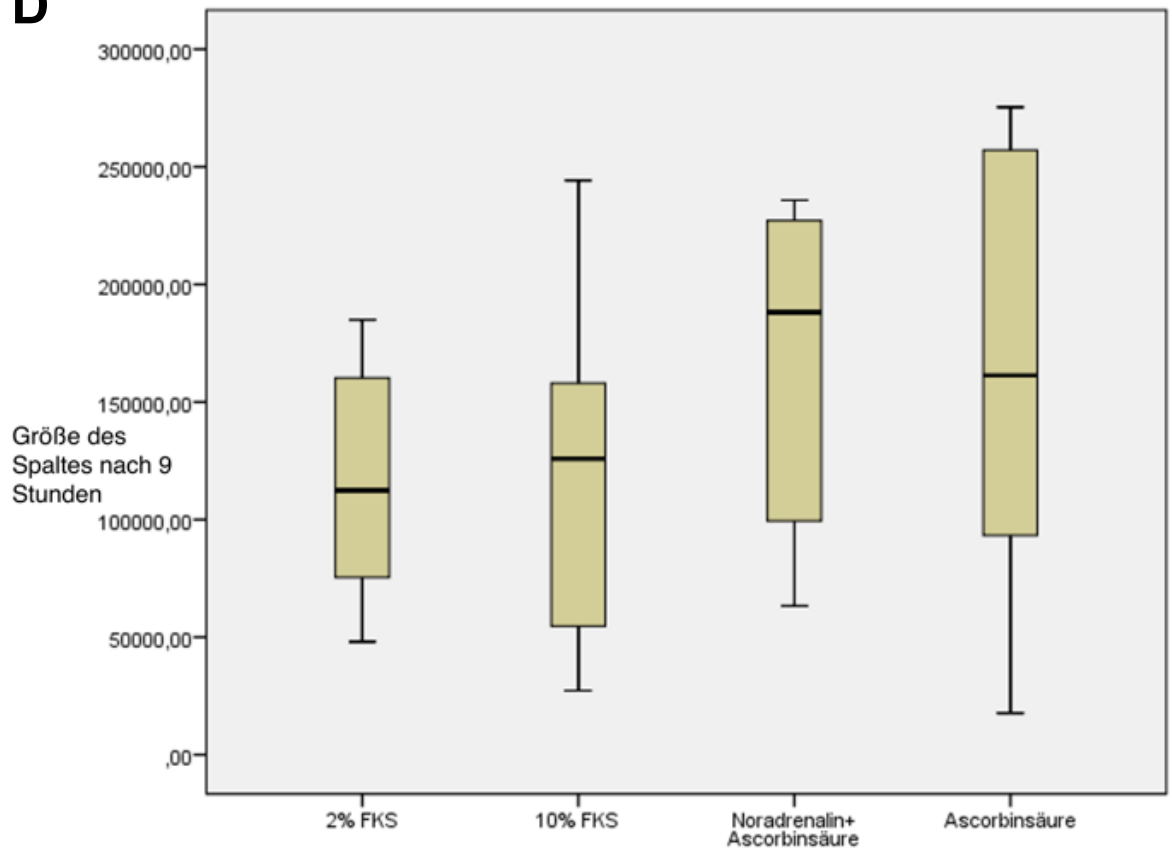
Anhang 1: Dargestellt sind die jeweiligen Boxplots für die Proliferationsassays mit Noradrenalin und Ascorbinsäure für Tag 3 (A), Tag 5 (B) und Tag 7 (C). An keinem der Tage fanden sich Ausreißer.

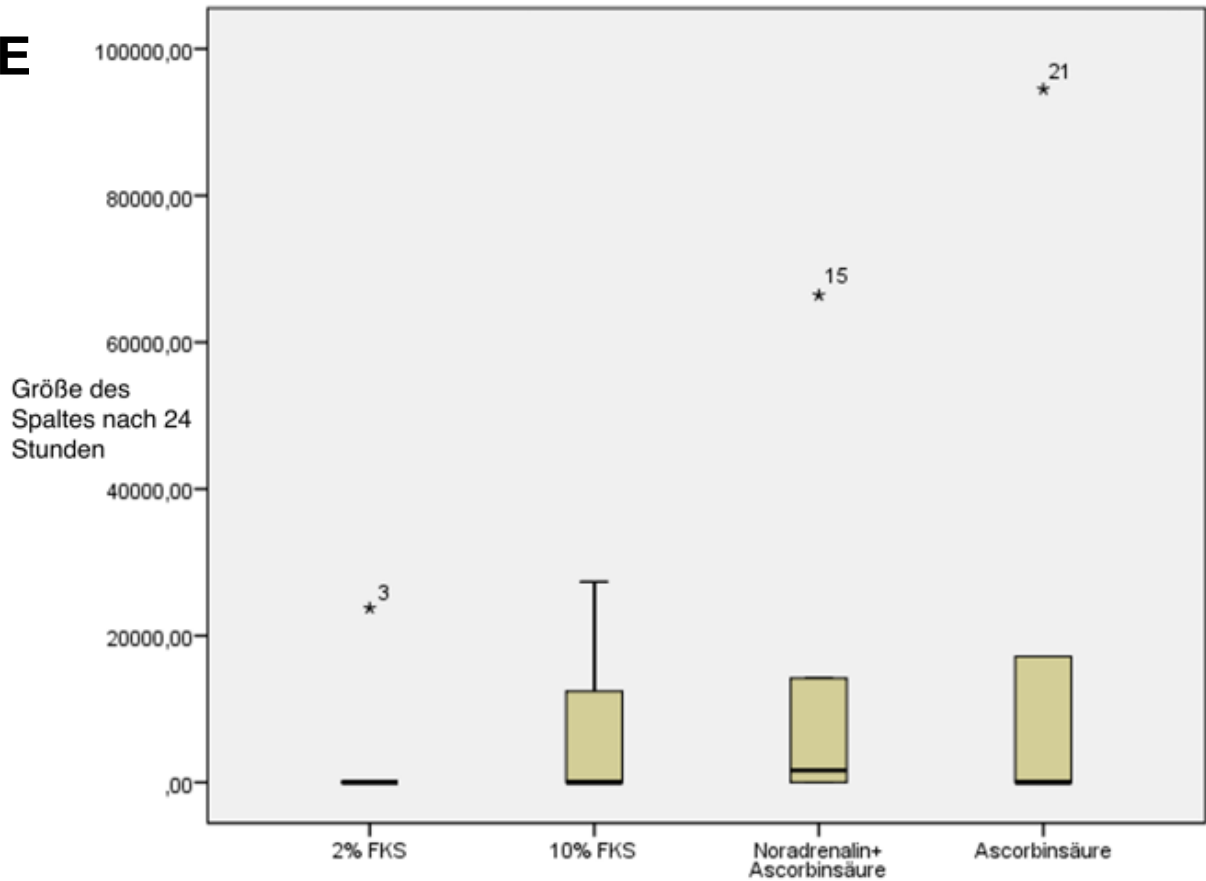
A**B**

C

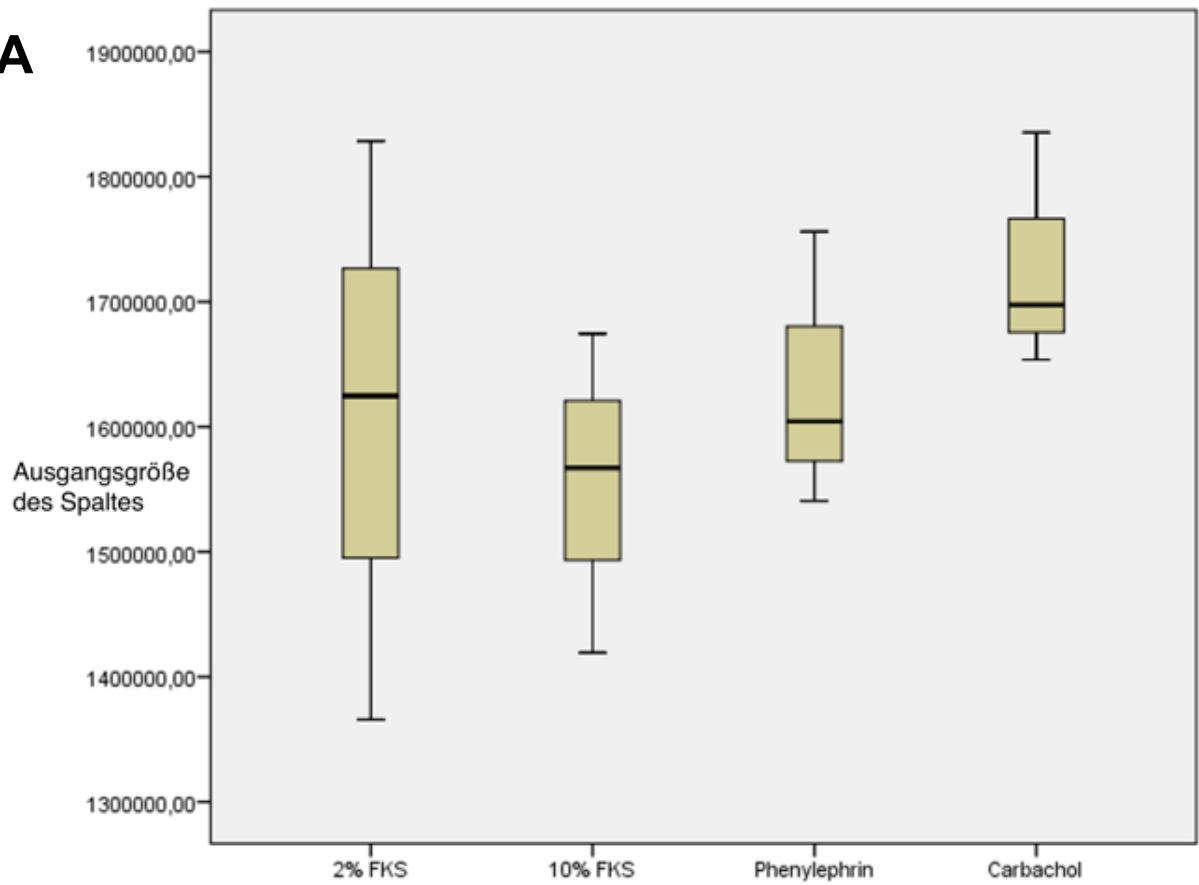
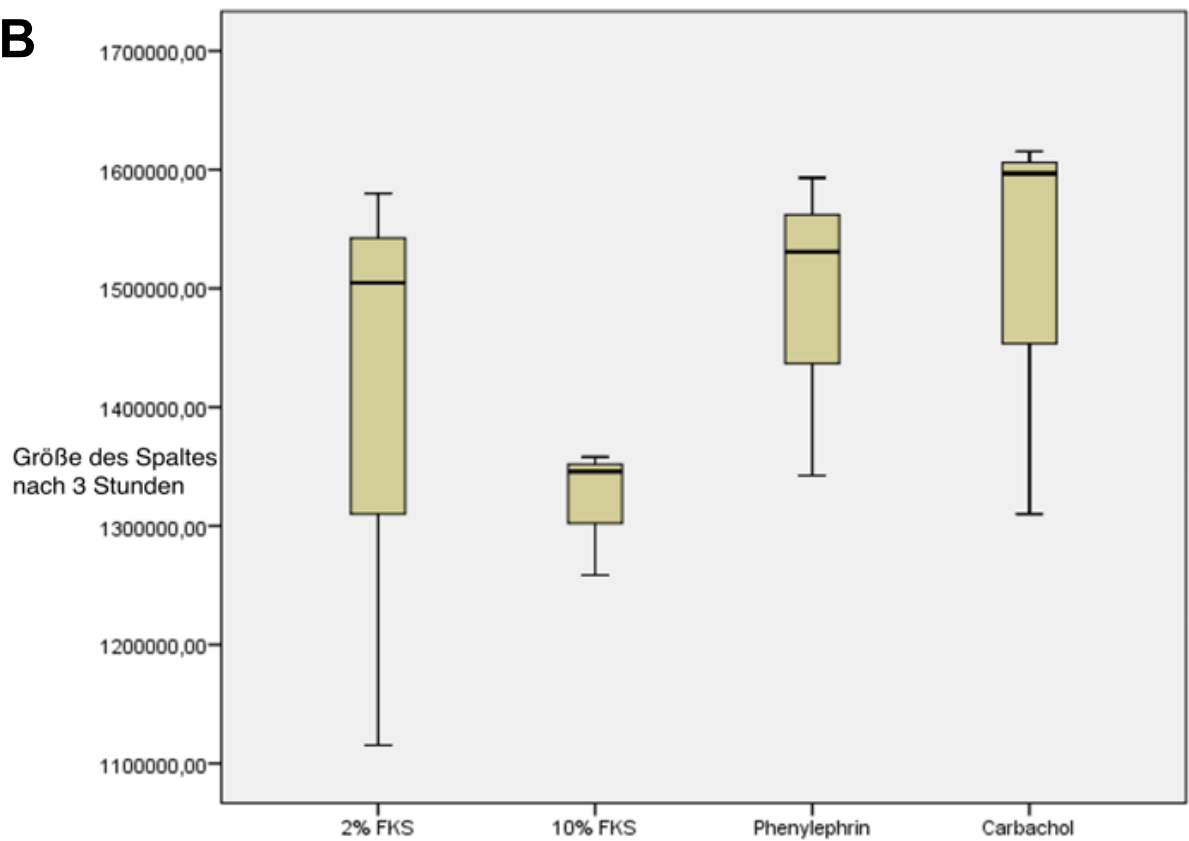
Anhang 2: Dargestellt sind die Boxplots zur Durchführung des Proliferationsassays mit Phenylephrin sowie Carbachol für Tag 3 (A), Tag 5 (B) und Tag 7 (C). An Tag 5 (mit Phenylephrin stimulierte Gruppe) sowie Tag 7 (Positivkontrolle) findet sich jeweils ein durch einen Kreis markierter Ausreißer. Diese sind jeweils mehr als den 1,5fachen, aber weniger als den 2,5fachen Interquartilsabstand von der Box entfernt.

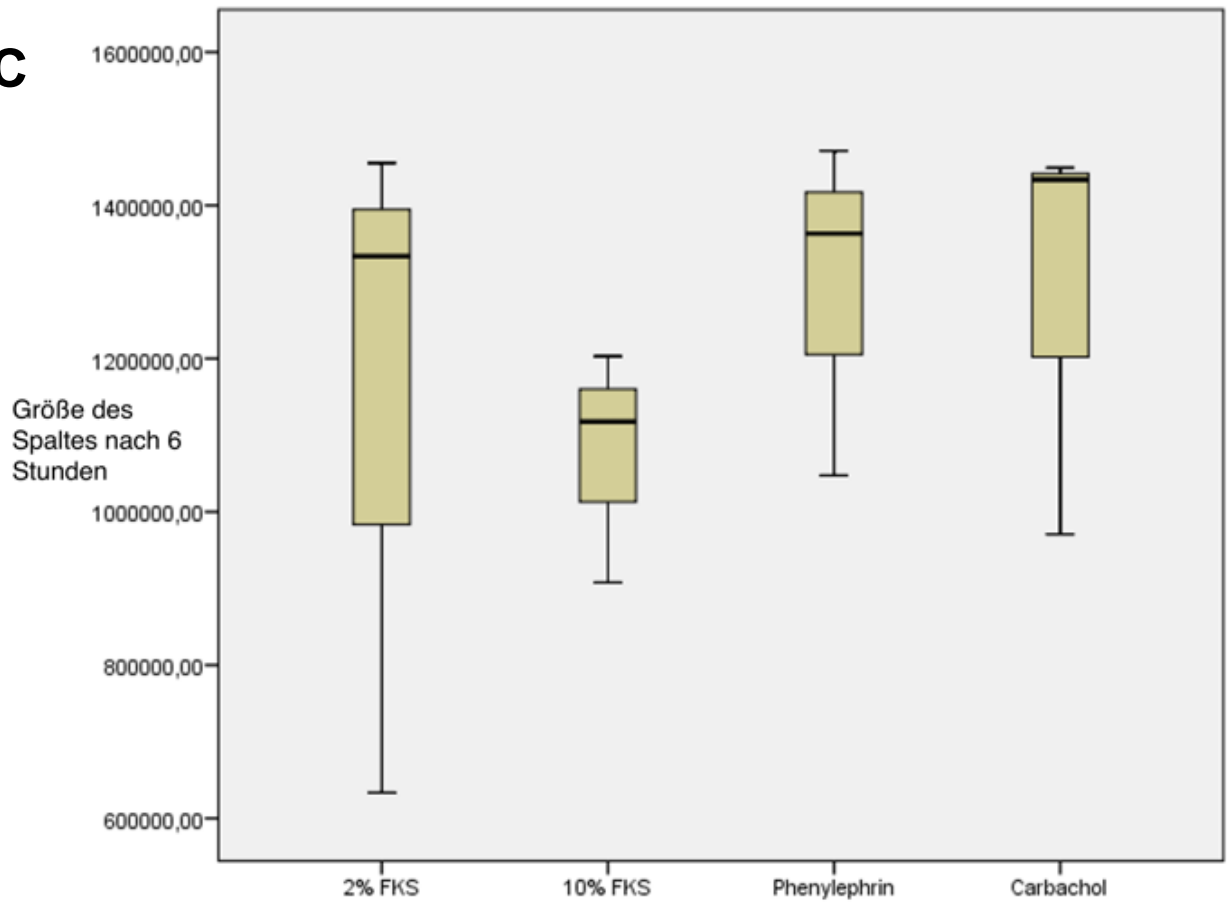
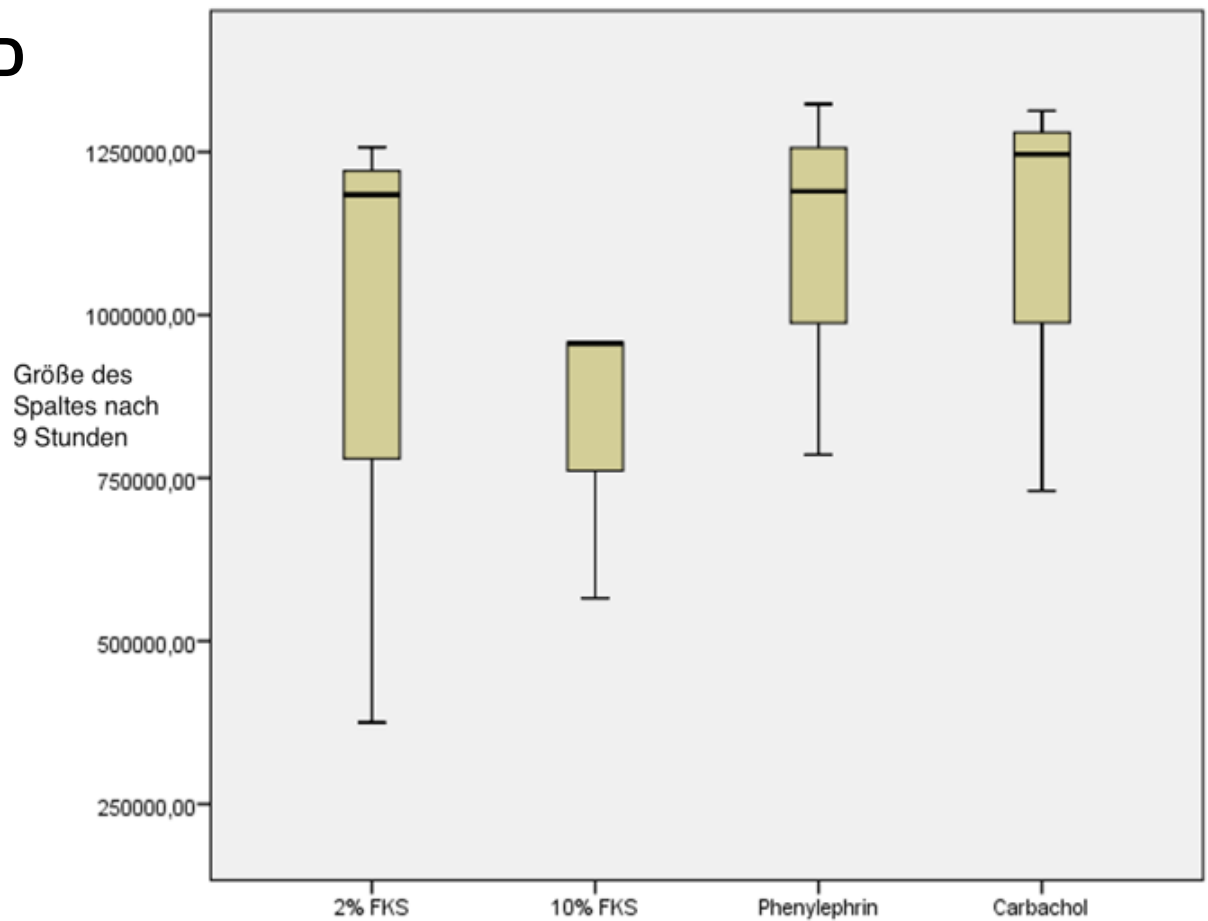
A**B**

C**D**

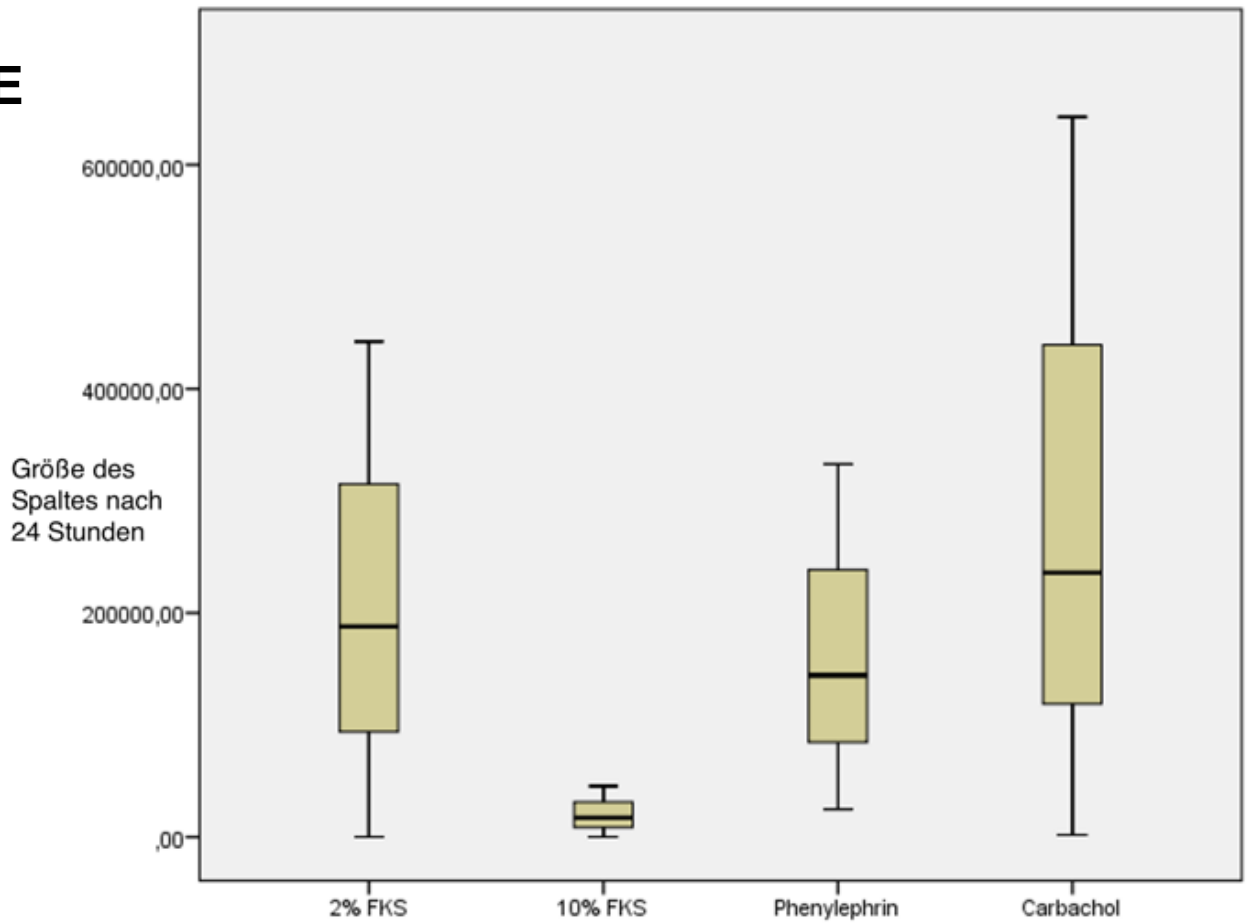
E

Anhang 3: Dargestellt sind die Boxplots zum Migrationsassay mit Noradrenalin und Ascorbinsäure, zu Beginn (A), nach 3 Stunden (B), nach 6 Stunden (C), nach 9 Stunden (D) sowie nach 24 Stunden (E). Zu Beginn zeigt sich in der Gruppe mit Ascorbinsäure ein Ausreißer, markiert durch den Kreis. Dieser ist mehr als den 1,5fachen, aber weniger als den 2,5fachen Interquartilsabstand von der Box entfernt. Nach 24 Stunden zeigen sich in mehreren Gruppen extreme Ausreißer, markiert durch den Stern. Diese sind jeweils mehr als den 2,5fachen Interquartilsabstand von der Box entfernt.

A**B**

C**D**

E



Anhang 4: Dargestellt sind die Boxplots zum Migrationsassay mit Phenylephrin und Carbachol, zu Beginn (A), nach 3 Stunden (B), nach 6 Stunden (C), nach 9 Stunden (D) sowie nach 24 Stunden (E). Es zeigen sich keine Ausreißer.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, einigen Personen zu danken, ohne deren Hilfe das Erstellen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Der erste Dank gilt meinem Doktorvater für das Überlassen des Themas dieser Promotionsarbeit, die immer motivierende und fachlich hervorragende Betreuung, die inhaltliche Beratung, die kritische Diskussion von Ideen sowie Ergebnissen und auch für die Bereitstellung der zur Durchführung notwendigen finanziellen Mittel.

Genauso gilt mein Dank für ihre ausgezeichnete praktische und theoretische Unterstützung, ihre jederzeit vorhandene Hilfsbereitschaft und für die Bereitstellung der genutzten Zelllinie, entscheidender Dokumente und kritischer Anmerkungen im Rahmen der Erstellung dieser Arbeit.

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich bei für die ausgeprägte Hilfsbereitschaft in allen Belangen und ihre geduldige Begleitung der Anfänge dieser Arbeit. Auch allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern im Labor der Augenklinik Mainz gilt mein Dank für ihre jeweilige Unterstützung.

Danken möchte ich auch für die Freundschaft und Gesellschaft, die ein Gelingen dieser Arbeit erst ermöglicht hat.

Abschließend danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern sowie meinen beiden Schwestern für ihre jahrelange Unterstützung, Rücksichtnahme und immerwährende Hilfsbereitschaft.

