

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde
am Klinikum rechts der Isar der
Technischen Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. Chris P. Lohmann

Ex vivo Untersuchung der Bioverträglichkeit des Glaskörperersatzstoffes Siluron Xtra[®] auf porkiner Netzhaut in der Perfusionskultur

Katharina Lanna Neuer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Mathias M. Maier

2. Prof. Dr. Dr. Chris P. Lohmann

Die Dissertation wurde am 14.03.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.02.2018 angenommen.

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1 | Verzeichnis der Abkürzungen | 3 |
| 2 | Einleitung | 4 |
| 2.1 | Vitreoretinale Erkrankungen | 4 |
| 2.2 | Anatomische Grundlagen | 6 |
| 2.3 | Der Glaskörper | 6 |
| 2.4 | Die Netzhaut | 7 |
| 2.5 | Das retinale Pigmentepithel | 9 |
| 3 | Verwendung eines porkinen Tiermodells | 10 |
| 4 | Silikonöle | 12 |
| 4.1 | Silikonöltamponaden nach Vitrektomie am menschlichen Auge | 12 |
| 4.2 | Zusammensetzung der Silikonöle | 13 |
| 5 | Fragestellung | 18 |
| 6 | Material und Methoden | 19 |
| 6.1 | Präparation von Netzhaut-Sheets | 19 |
| 6.2 | Reinigung und Abbau der Perfusionsmaterialien | 23 |
| 7 | Histologische Bearbeitung | 24 |
| 7.1 | Fixierung und Paraffineinbettung | 24 |
| 7.2 | HE Färbung der Paraffinschnitte | 26 |
| 7.3 | Immunhistochemische Färbung der Paraffinschnitte | 26 |
| 7.4 | GFAP | 27 |
| 7.5 | Ki67 | 28 |
| 8 | Auswertung | 29 |
| 9 | Ergebnisse | 30 |
| 9.1 | Gewebepräparation, Perfusion und Bearbeitung | 30 |
| 9.2 | Strukturelle Beurteilung in HE Färbung | 31 |
| 9.3 | Immunhistochemische Marker | 32 |
| 9.4 | Einfluss der Position in der Perfusionskammer und bei der Mediumperfusion | 34 |
| 9.5 | Luftblasen in den Perfusionsschläuchen und Kammern | 34 |
| 9.6 | GFAP Markierung im Zusammenhang mit mechanischen Schäden | 35 |
| 10 | Diskussion | 36 |
| 10.1 | Klinische Ergebnisse von Silikonöl als Endotamponade nach PPV | 36 |
| 10.2 | Silikonölentfernung | 38 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 10.3 | Das in vitro Perfusionssystem | 39 |
| 10.4 | Proliferation | 39 |
| 10.5 | GFAP Expression | 40 |
| 10.6 | Luftblasen in der Perfusion | 41 |
| 10.7 | Auswertung und Versuchsdesign | 42 |
| 10.8 | Schlussfolgerung | 44 |
| 11 | Zusammenfassung | 45 |
| 12 | Verzeichnis der Abbildungen | 47 |
| 12.1 | Abbildungen Präparation und Perfusion | 47 |
| 12.2 | Abbildungen histologischer Präparate | 50 |
| 12.3 | HE Färbung: | 50 |
| 12.4 | GFAP Färbung: | 51 |
| 12.5 | Ki67 Färbung: | 52 |
| 13 | Literaturverzeichnis | 54 |
| 14 | Anhang | 60 |
| 14.1 | Morphologische Auswertung der Präparate | 60 |
| 14.2 | Statistische Auswertung mit SPSS | 60 |
| 14.3 | Färbemethoden | 62 |
| 14.4 | Materialien | 63 |
| 15 | Danksagung | 68 |

1 Verzeichnis der Abkürzungen

| | |
|-----------|--|
| +S | + Siluron Xtra [®] |
| AEC | 3-Amino-9-EthylCarbazol |
| AK | Antikörper |
| Aqua dest | Destilliertes Wasser |
| BSS | Balanced Salt Solution |
| CE | Communauté Européenne / Europäische Gemeinschaft |
| CNV | Choroidale Neovaskularisation |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| EtOH | Ethanol |
| GFAP | Glial Fibrillary Acidic Protein |
| HE | Hämatoxylin Eosin |
| HNH | Humane Netzhaut |
| HRP | Horse-Radish-Peroxidase |
| Ki67 | Antigen Ki-67 |
| MC | Müller'sche Stützzellen |
| NaCl | Natrium Chlorid |
| NH | Netzhaut |
| OCT | Optische Kohärenz Tomographie |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PNH | Porkine Netzhaut |
| PPV | Pars Plana Vitrektomie |
| PS | Penicillin Streptomycin |
| RER | Raues endoplasmatisches Retikulum |
| RPE | Retinales Pigmentepithel |
| VG | Versuchsgruppe |

2 Einleitung

Das Ziel dieser Promotionsschrift ist die Untersuchung der organspezifischen Bioverträglichkeit des Glaskörperersatzstoffes Siluron Xtra[®]. Die untersuchte Substanz ist ein Silikonöl, der Firma Fluoron (Ulm, Deutschland), das in ex vivo Versuchen auf porkiner Netzhaut getestet wurde.

Dieses Silikonöl ist seit 2013 in der Europäischen Gemeinschaft zugelassen (CE Zulassungsnummer: DE/CA40/00881/20) und wird bereits therapeutisch im Rahmen der Pars plana Vitrektomie (PPV) an Patienten verwendet.

Die allgemeine Verträglichkeit von Silikonölen als Glaskörperersatzstoff wurde bereits in mehreren klinischen Studien untersucht. Für das untersuchte Silikonöl, Siluron Xtra[®] liegen derzeit noch keine klinischen Ergebnisse vor. Die Anwendung des Öls am Tiermodell mit histologischer Untersuchung der Bioverträglichkeit auf der Netzhaut wurde bisher noch nie durchgeführt.

2.1 Vitreoretinale Erkrankungen

Als vitreoretinale Erkrankungen werden Erkrankungen der Netzhaut (NH) und des Glaskörpers des Auges bezeichnet. Hierzu gehören die Netzhautablösung, diabetische Netzhauterkrankungen, Erkrankungen des vitreoretinalen Überganges, Blutungen in den Glaskörperraum, entzündliche Erkrankungen, Gefäßverschlüsse der Netzhaut, Makulaerkrankungen und Tumoren im Auge.

Diese Erkrankungen stellen häufige Indikationen für einen operativen Eingriff am Auge dar, bei dem der Glaskörper entfernt wird. Das Verfahren wird als Vitrektomie bezeichnet und wird standartmäßig als PPV durchgeführt. Dabei werden am Auge des Patienten, bei lokaler Betäubung, dünne Operationsinstrumente durch die Pars plana am Ziliarkörper, 3.5 mm hinter dem Limbus, eingeführt. Während der Operation wird der Bulbus von physiologischer Salzlösung (BSS) in Form gehalten. Durch einen kleinen Leuchtstab wird das Auge von innen beleuchtet während der Operateur mit dem Vitrektomie-Schneider den Glaskörper von der Netzhaut löst, schneidet und absaugt. Durch die Verknüpfung des Operationsmikroskops mit einer Lupe wird dem Operateur ein vergrößerter Einblick ins Auge gewährt (Lang 2014).

Bei der Netzhautablösung kommt es zur Abhebung der Netzhaut vom retinalen Pigmentepithel. Die häufigste Form der Netzhautablösung ist die rhegmatogene

Netzhautablösung. Durch den natürlichen Alterungsprozess schrumpft der Glaskörper und zieht dabei an der Netzhaut und führt so zu einer Ablösung des Gewebes vom retinalen Pigmentepithel (RPE). Durch den Zug des Glaskörpers kann es zu Rissen in der Netzhaut kommen sodass der verflüssigte Glaskörper durch die Risse unter die Netzhaut gelangen kann.

Es handelt sich bei der Netzhautablösung um einen ophthalmologischen Notfall bei dem ein operativer Eingriff möglichst rasch erfolgen sollte. Durch die Unterversorgung der NH mit Nährstoffen aus der Aderhaut, die dem RPE von extern anliegt, droht das Absterben des gelösten Areals und somit eine mögliche Erblindung des Patienten.

Kleine Netzhautablösungen lassen sich häufig schon mit einer Laserkoagulation wieder an das RPE fixieren. Netzhautlöcher können aber auch mit einer Silikonschaumplombe versorgt werden, die von außen auf die Sklera aufgenäht wird, wodurch die Augapfelwand von außen eingedrückt wird. Mit einer Kryosonde werden NH und RPE durch eine künstliche Narbe wieder verbunden. Bei multiplen oder nicht auffindbaren Netzhautlöchern kann auch eine Cerclage, ein Silikonband, um den Augapfel geschnürt werden. Diese Verfahren werden allerdings hauptsächlich bei unkomplizierten Netzhautablösungen eingesetzt

Bei der komplizierten Netzhautablösung, z.B. traumatisch induzierte Ablösungen oder Netzhautablösungen mit proliferativer Vitreoretinopathie, ist die PPV mit einer anschließenden Füllung des Hohlraums mit Gas oder Silikonöl die Therapie der Wahl. Glaskörperersatzstoffe werden dabei zur Stabilisierung des Bulbus und als Endotamponade eingesetzt um die abgelöste Netzhaut wieder anzudrücken (Lang 2014).

2.2 Anatomische Grundlagen

Durchschnitt des menschlichen Augapfels

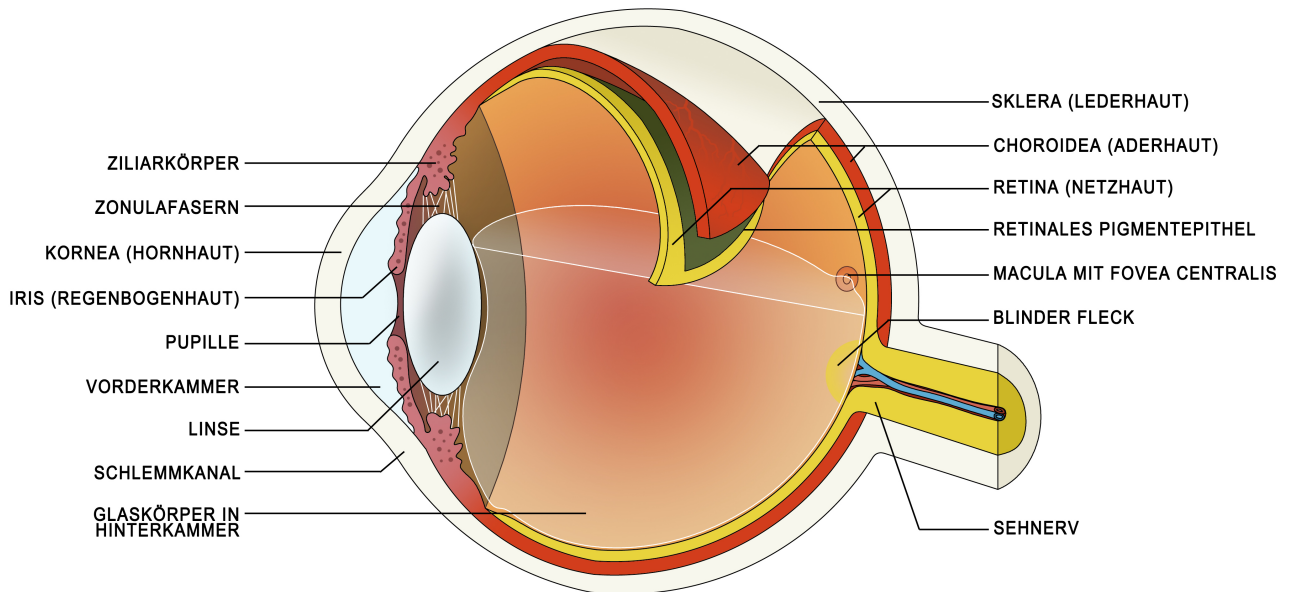


Abbildung 1 : Fabian Göddert © , 2015

Abbildung 1 ist ein anatomischer Querschnitt durch das menschliche Auge und stellt den Glaskörper dar, der sich im Inneren des Auges befindet und der Netzhaut aufliegt. Das retinale Pigmentepithel liegt zwischen Retina (Netzhaut) und Choroidea (Aderhaut).

2.3 Der Glaskörper

Der Glaskörper (Corpus vitreum) besitzt eine durchsichtige, gelartige Konsistenz, die sich im hinteren Abschnitt des Auges befindet und den Bulbus von innen ausfüllt. Er besteht zu 98% aus Wasser und wird durch ein Kollagenfasengerüst stabilisiert, in dem Hydrogele eingebettet sind. An der Papille, den Gefäßen und in der Peripherie ist der Glaskörper an die Netzhaut angeheftet. So kann es im Alter durch Flüssigkeitsverlust und Schrumpfung des Glaskörpers zu Zugkräften (Traktion) an der Netzhaut und damit verbunden zu Netzhautrissen und zu einer Netzhautablösung kommen (Lang 2014).

Der Brechungsindex des Glaskörpers entspricht dem Brechungsindex des Kammerwassers, dem Nährmedium des Auges, welches vom Ziliarkörper produziert wird.

Durch Gefäßproliferationen, wie sie bei der diabetischen Retinopathie vorkommen, perforierende Verletzungen oder Netzhautablösungen kann es zu Blutungen in den Glaskörper kommen, die beim Patienten als plötzlich auftretende, dunkle Trübungen wahrgenommen werden. Sofern eine Netzhautablösung durch Ultraschall ausgeschlossen werden kann, kann man bei initialer Blutung zunächst abwarten, ob die Blutung innerhalb einiger Tage spontan resorbiert wird. Bei Verdacht auf eine Netzhautablösung hingegen oder bei anhaltender Blutung, ist eine Glaskörperentfernung (Vitrektomie) indiziert.

2.4 Die Netzhaut

Der neurosensorische Teil der Netzhaut (Retina) ist eine Schicht spezialisierter Nervengewebszellen die sich im hinteren Abschnitt des Auges befindet und entwicklungsgeschichtlich und funktionell Teil des zentralen Nervensystems ist (Wachtlin und Kellner 2008). Es handelt sich um ein durchsichtiges Gewebe mit einer Dicke von 0,1 - 0,5 mm (Sachsenweger und Klauss 2014).

Nach posterior liegt die Retina dem RPE, ohne Verwachsungen, locker auf (Wachtlin und Kellner 2008).

Nach zentral setzt sie sich mit dem Nervus opticus fort, der die Sinneseindrücke in das Gehirn weiterleitet.

Funktionell lässt sich die Retina in drei hintereinander geschaltete Neurone, die Photorezeptoren, die Bipolarzellen und die Ganglienzellen, einteilen. Das einfallende Licht, welches zunächst Hornhaut, Linse und Glaskörper passiert, durchdringt alle Schichten der Netzhaut bis es zuletzt das 1. Neuron (Photorezeptoren) erreicht. Histologisch lässt sich die Netzhaut in 10 Schichten unterteilen (*Abbildung 2*).

Die Photorezeptorschicht, die unmittelbar dem RPE aufliegt, setzt sich aus ca. 7 Millionen Zapfen und 120 Millionen Stäbchen zusammen (Grehn 2012).

Sie lässt sich in ein permanentes Innensegment und ein sich ständig erneuerndes Außensegment einteilen. Die Zellkörper der Photorezeptoren bilden die äußere Körnerschicht. Daran anliegend befindet sich die äußere plexiforme Schicht, in der die Zellfortsätze der Photorezeptoren sich mit den Horizontal- und Bipolarzellen verknüpfen. Die Horizontalzellen ermöglichen eine Quervernetzung der Zellen. Die

Bipolarzellen sind für die Weiterleitung der Lichtimpulse zuständig. Die Zellkörper der Bipolarzellen bilden die anliegende innere Körnerschicht. In dieser befinden sich auch die Zellkerne der amakrinen Zellen, die ebenfalls quervernetzen, und die Kerne der Müller'schen Stützzellen. Die Müller'schen Stützzellen ziehen sich durch die gesamte Netzhaut und verleihen ihr, durch ihr stützendes Gerüst, eine stabile Form. Der inneren Körnerschicht liegt die innere plexiforme Schicht an. Hier entstehen Synapsen zwischen Axonen der bipolaren Zellen und Dendriten der Ganglien- und amakrinen Zellen. Die Axone der Ganglienzellen laufen dann parallel auf der Netzhaut als Nervenfaserschicht zum Nervus opticus zusammen. Die Membrana limitans interna bildet zum Schluss die Grenzmembran zwischen Netzhaut und Glaskörper (Sachsenweger und Klauss 2014). Der histologische Aufbau der Retina ist zur Verdeutlichung in Abbildung 1 und Abbildung 2 abgebildet.

Histologischer Aufbau der humanen Netzhaut in HE Färbung

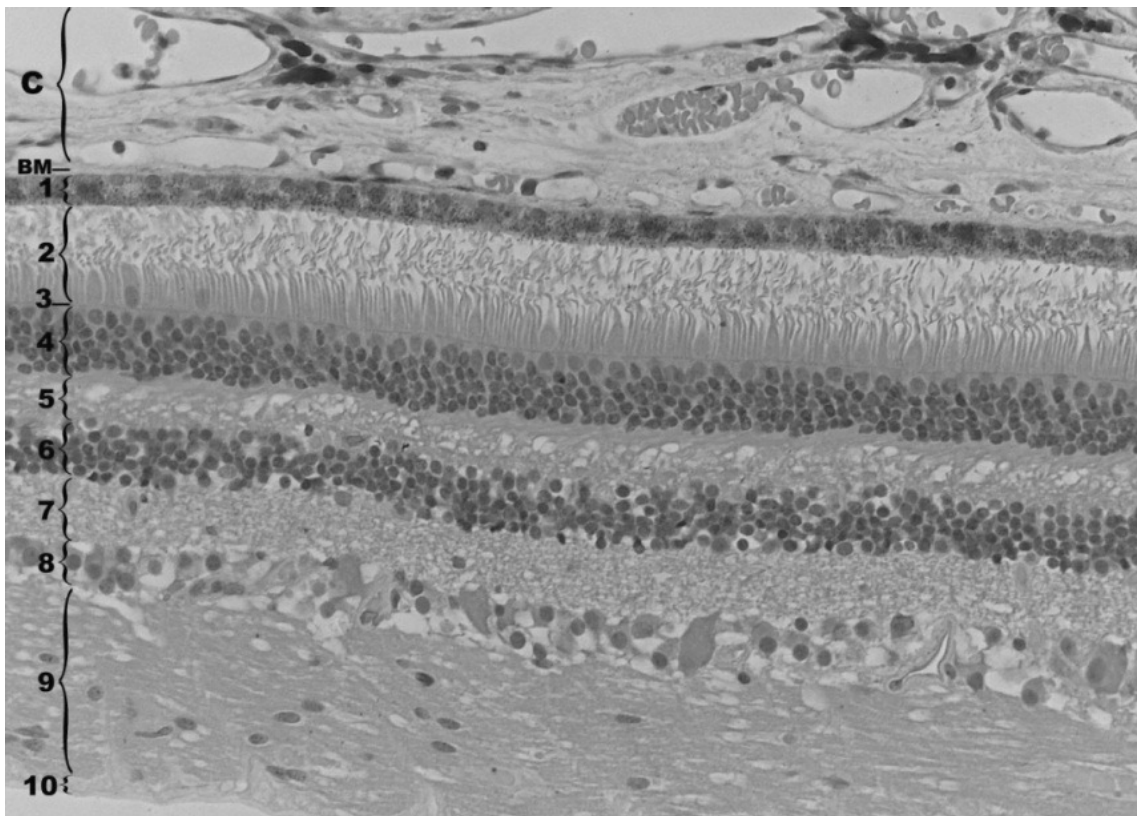


Abbildung 2 : Triviño, A., et al., Effects of Hypercholesterolaemia in the Retina. Ocular Diseases. 2012 (Triviño, Rojas et al. 2012)

1. Retinales Pigmentepithel, 2. Photorezeptorschicht, 3. Membrana limitans externa, 4. Äußere nukleäre Schicht, 5. Äußere plexiforme Schicht, 6. Innere nukleäre Schicht, 7. Innere plexiforme Schicht, 8. Ganglienzellschicht, 9. Nervenfaserschicht, 10. Membrana limitans interna, BM: Bruch-Membran, C: Gefäßschicht der Choroidea (Aderhaut)

2.5 Das retinale Pigmentepithel

Das retinale Pigmentepithel (RPE) bildet die äußerste Schicht der Netzhaut. Sie liegt der Bruchmembran an, die das RPE von der Aderhaut abgrenzt. Benachbarte Pigmentzellen sind durch feste Zonulae occludentes miteinander verbunden und bilden so das morphologische Korrelat der äußeren Blut-Retina-Schranke. Lediglich niedermolekulare Substanzen und Nährstoffe können diese Barriere von der Aderhaut in die Netzhaut passieren.

NH und RPE sind nicht miteinander verwachsen. Lediglich im Bereich der Papille und an der Ora serrata besteht eine feste Verbindung zwischen Netzhaut und RPE. Durch zahlreiche Fältelungen in der apikalen Zellmembran des RPE, welche in die Außensegmente der Photorezeptoren eingebettet sind, wird jedoch eine funktionelle und mechanische Verbindung zwischen RPE und Netzhaut ermöglicht.

Physiologisch erfüllt das RPE viele verschiedene Aufgaben. Zu den wichtigsten Funktionen gehört die Aufrechterhaltung der Blut-Retina-Schranke um den Transport von Nährstoffen in die äußeren Retinaschichten zu ermöglichen. Es ist auch zuständig für die Wiederverwertung von Vitamin A, für die Phagozytose der sich ständig erneuernden äußeren Segmente der Photorezeptoren, die Absorption von Streulicht und dem Wärmeaustausch mit der Aderhaut.

Das RPE und die Photorezeptoren werden per Diffusion von der Choriokapillaris mit Sauerstoff versorgt (Sachsenweger und Klauss 2014).

Auf Grund der Vielzahl wichtiger Funktionen, die das RPE im menschlichen Auge erfüllt wurde RPE in dieser Untersuchung auch getrennt unter dem Einfluss von Siluron Xtra[®] untersucht (Versuchsgruppe 3).

Auf das klinische Bild übertragen wird dabei die Situation eines Netzhautrisses oder Netzhautlochs imitiert, bei der es zu direktem Kontakt zwischen RPE mit Silikonöl kommen könnte.

3 Verwendung eines porkinen Tiermodells

Für diese Untersuchung wurden frische porkine Netzhäute als ex vivo Tiermodell verwendet.

Die porkine Retina ähnelt sowohl makro- als auch mikroskopisch sehr der menschlichen Retina, weshalb sie häufig als Modell für retinale Studien eingesetzt wird.

Tiermodelle eignen sich vor allem für prospektive Interventionsstudien am Menschen. So wurden porkine Augen unter anderem zur Testung neuer Endotamponaden (Rodrigues, Shiroma et al. 2014) und autologen RPE-Choroid Grafts (Fernandez-Bueno, Rodriguez de la Rúa et al. 2013) verwendet die für den Menschen noch nicht zugelassen gewesen sind. Sie eignen sich zur Toxizitätsprüfung neuer pharmakologischer Substanzen, beispielsweise eines Reinigungsmittels (Originaltext: Cleaner), das verspricht emulsifizierte Öltropfen aus dem post vitrektomierten Auge einzukapseln und zu entfernen (Chan, Wong et al. 2015).

Auch neue operative Verfahren werden zunächst am porkinen Auge getestet. So wurde festgestellt, dass das Erhitzen des Glaskörpers auf $44\pm 1^\circ\text{C}$ zu einer irreversiblen Verflüssigung des Glaskörpers führt, wodurch dieser sich besser von der Netzhaut ablösen ließ. Dieses Verfahren könnte sich auch in der Vitrektomie als Vorteilhaft erweisen, zumal Zelltod erst ab einer Temperatur von $55-58^\circ\text{C}$ eintritt (Chen und Weiland 2013).

Die distinktiven Merkmale der porkinen Netzhaut (PNH), die sich von der humanen Netzhaut (HNH) abheben und für die Beurteilung der retinalen Ultrastruktur eine Rolle spielen sind in Tabelle 1 zusammengefasst, Abbildung 3 a) und b) verbildlichen die lichtmikroskopischen Aufnahmen der porkinen und humanen Netzhautstruktur.

Tabelle 1 : Distinktive histologische Merkmale der porkinen Netzhaut (Beauchemin 1974)

| | |
|--------------------------------|--|
| Verteilung der Photorezeptoren | Relativ gleichmäßige Verteilung von Stäbchen und Zapfen in der PNH (HNH: Zapfen primär zentral und Stäbchen primär parafoveal) |
| Struktur der Zapfen | Vergrößerte, polymorphe, ellipsoidale Mitochondrien Transversal ausgerichtete Cristae (HNH: longitudinale Ausrichtung) (Missotten, Appelmans et al. 1963, Hogan, Alvarado et al. 1971) Mikrotubuläre Strukturen vorhanden (Funktion jedoch unklar) |
| Horizontalzellen | Vergrößert mit zytoplasmatischen Ausläufern (HNH: keine Ausläufer) |
| Innere Körnerschicht | Prominentes RER und Granula gefüllte Mitochondrien |
| Innere NH | Vorkommen einer Vielzahl von Astrozyten |

Übertragen aus „The Fine Structure of Pig’s Retina“, Marie Louise Beachemin (1973)

Porkine Retina in (Hämatoxylin Eosin) und humane Retina (Toluidin Blau)

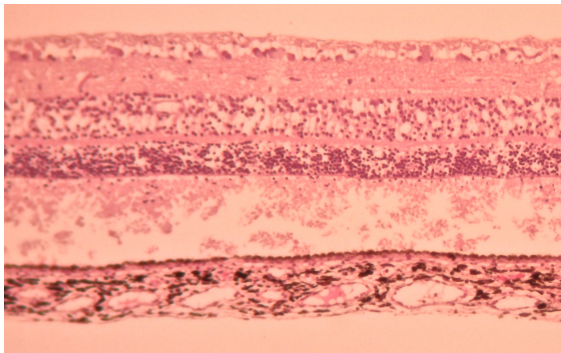


Abbildung 3 a)

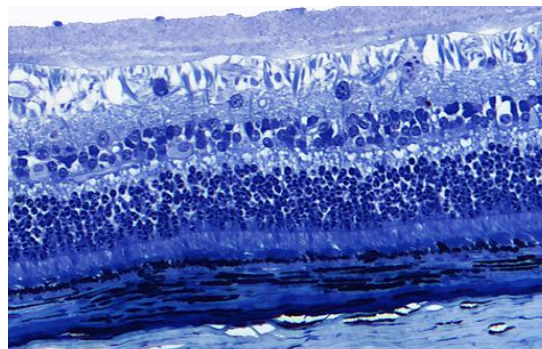


Abbildung 4 b)

Zusammenfassend sind die morphologischen Unterschiede zwischen porkiner und humaner Retina gering, weshalb sich die Untersuchung am porkinen Auge auch für dieses Experiment sehr gut eignet.

4 Silikonöle

4.1 Silikonöltamponaden nach Vitrektomie am menschlichen Auge

Die Vitrektomie ist ein operatives Verfahren in der Augenheilkunde bei dem der Glaskörper aus dem menschlichen Auge entfernt wird. Häufige Indikation für die Durchführung dieser Operation sind Netzhautablösungen, die fortgeschrittene diabetische Retinopathie und ausgeprägte Glaskörperblutungen. Das Standardverfahren für die Glaskörperentfernung ist die Pars plana Vitrektomie (PPV), ein minimalinvasives Verfahren, das es ermöglicht den Glaskörper mit Hilfe von kleinen Operationsinstrumenten durch Zugänge an der Pars Plana herauszuschneiden, ohne den gesamten Bulbus zu eröffnen.

Nach vollständiger Entfernung des Glaskörpers muss dieser von einem Glaskörperersatzstoff ersetzt werden, um die Netzhaut nach der Operation wieder anzudrücken und den Bulbus zu stabilisieren.

Hierfür können ein Luftgemisch aus Gas (Schwefelhexafluorid, SF₆) und Luft oder Silikonöl als innere Tamponade eingesetzt werden (Lang 2014).

Das Füllen des Bulbus mit Gas hat den Vorteil, dass das Gas innerhalb von 1-4 Wochen vom Körper resorbiert und gegen Kammerwasser ausgetauscht wird. Somit ist lediglich ein einziger operativer Eingriff am Patienten notwendig. Die Füllung mit Gas hat jedoch auch einige Nachteile. So muss der Augendruck regelmäßig in kurzen Abständen kontrolliert werden, da es durch Stickstoffaufnahme aus dem Blut zu weiterer Expansion des Gases kommt. Aus dem selben Grund ist es den Patienten auch verboten in dem Zeitraum zu fliegen oder sich auf Höhenwanderungen zu begeben, da das Gas dann aufgrund der geringen Umgebungsluftdrücke weiter expandieren würde. Durch die zunehmende Flüssigkeitsfüllung im Auge steigt das Gas außerdem auf Grund der geringeren Dichte nach oben. Deswegen ist es notwendig, dass die Patienten, abhängig von der Lokalisation der Verletzung an der Netzhaut eine bestimmte Lagerung einnehmen. Vor allem die Bauchlagerung und die nach unten gerichtete Position können für den Patienten schwierig und in dem langen Zeitraum stark beeinträchtigend sein.

Besonders bei komplizierten Netzhautablösungen oder bei Zweiteingriffen ist der Gebrauch einer Silikonöltamponade oftmals nötig. Das Öl hat den Vorteil, dass es als

längerfristige Tamponade eingesetzt werden kann. Da es nicht vom Körper resorbiert wird kann es mehrere Monate im Auge bleiben und muss dann aber bei einem zweiten operativen Eingriff wieder entfernt werden.

Durch die höhere Dichte des Öls verändert sich temporär die Brechkraft des Auges des Patienten, so dass er möglicherweise seine Brille anpassen muss. Darüber hinaus hat der Patient das Gefühl durch ein Goldfischglas zu gucken. Durch Kontakt mit der Linse kommt es außerdem zu einem schnelleren Fortschreiten der grauen Stars (Linsentrübung) oder kann beim aphaken Patienten (ohne Linse) zu Hornhautschäden führen (Grehn 2012, Lang 2014).

4.2 Zusammensetzung der Silikonöle

Seit ihrer Einführung in die Augenheilkunde in den 60er Jahren durch Paul Cibis (Feibel und Blodi 2013), werden Silikonöltamponaden standartmäßig nach PPV eingesetzt.

Eine häufige Komplikation im Langzeitgebrauch von Silikonölen ist ihre Eigenschaft zu emulsifizieren. Das bedeutet, dass es durch die von den Augenbewegungen ausgelösten Scherkräfte, zwischen den Öl- und Wasserschichten zur Ausbildung von Öltröpfchen kommen kann. Erste Emulsifikationen können innerhalb von 3 Monaten nach Operation auftreten (Odrobina und Laudanska-Olszewska 2014), weshalb die Silikonöle in der Regel nach 2-3 Monaten, in einem zweiten operativen Eingriff, wieder aus dem Auge entfernt werden. Die Öltröpfchen können phagozytiert aber nicht abgebaut werden und können auch nach dem Entfernen des Silikonöls im Auge des Patienten verweilen (Williams, Day et al. 2011). Emulsifikation in vivo kann beeinflusst sein durch rheologische Charakteristika der Öle, Hämorrhagien und Inflammation im Auge (Bartov, Pennarola et al. 1992), Augenbewegung (Yilmaz und Guler 2008) und Verunreinigung der Öle (Gabel, Kampik et al. 1987, Nakamura, Refojo et al. 1990, Bambas, Eckardt et al. 1995, Pastor, Del Nozal et al. 2006) (Caramoy, Hagedorn et al. 2011) (Maier, Engelmann et al. 2011).

Im Verlauf könnten die Öltröpfchen zu einem sekundärem Glaukom, Entzündungen und epiretinaler Membranproliferation führen (Caramoy, Schroder et al. 2010). Banaee, T. (2012) berichtet von einem Fall, in dem sich bei einen 16 jährigen Jungen Silikonöltropfen abgesetzt haben und es zu einer Irisdepigmentation und zum Ausschwemmen von Pigmentgranula in die Vorderkammer und den Glaskörperraum kam. Ein toxischer Effekt durch die Ölpartikel auf weitere Strukturen des Auges

lassen sich nicht ausschließen (Banaee 2012). Auch Lee, J.H. et al. berichten 2014 von einem Fall, bei dem ein 30 jähriger Patient nach PPV mit Silikonöltamponde eine schwerwiegende Endophthalmitis erlitt. Silikonöl Leakage und große Silikonöl Granulome führten in diesem Fall zu schwerwiegenden Komplikationen, die letztendlich eine Eviszeration des Auges indizierten (Lee, Kim et al. 2014).

2014 wurde auf der DOG (Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft) in Leipzig ein Projekt zu intra- und subretinalen Silikonölablagerungen in Augen mit langfristiger Silikonöltamponade vorgestellt (Prause K. 2014). Histologische Schnitte der Augen wurden angefertigt, die zum Zeitpunkt der Eukleation, auf Grund von komplizierten Netzhautablösungen, in einem Zeitraum von 9-338 Monaten mit Silikonöl tamponiert waren. Bei 50% der Augen waren intraretinal Silikonölvakuolen nachzuweisen, es ließ sich jedoch keine Korrelation zwischen der Dauer der Silikonöltamponade und dem Ausmaß der Gewebsimprägation feststellen.

In den letzten Jahren gab es viele neuere Entwicklungen der Silikonöle, um ihre Emulsifikationsresistenz zu verbessern.

In Studien konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von kleinen Mengen langkettiger Silikonölmoleküle die Dehnviskosität des Öls erhöht und bei Erhalt der ursprünglichen Scherviskosität, die Emulsifikationsrate herabsetzt werden kann (Caramoy, Schroder et al. 2010). Die Viskosität der Silikonöle ist proportional zum Anteil high molecular weight (HMW) Komponenten, Polymere mit einem hohem Molekulargewicht. Es wurde festgestellt, dass die Zugabe von HMW Polymeren die Flüssigkeitselastizität erhöht und somit die Emulsifikationstendenz herabsetzt. Die Zugabe von mehr als 10% HMW Polymere zeigte jedoch eine Abnahme der Elastizität. Gemische mit weniger als 10% HMW Polymeren zeigten visköse Eigenschaften welches ihre Handhabung in der vitreoretinalen Operation erschwerten (Caramoy, Hagedorn et al. 2011). Die Zunahme der Silikonölviskosität hat den Vorteil die Emulsifikationsresistenz zu erhöhen, gleichzeitig erschwert es aber auch die Injizierbarkeit des Öls ins Auge. Silikonöle die nur einem kleinen Anteil HMW Komponenten enthalten sind bei gleicher Scherviskosität leichter zu injizieren als Einkomponentensilikonöle (Williams, Day et al. 2011).

Die folgenden Tabellen 2-4 zeigen den Vergleich 4 verschiedener Silikonöle die zur Zeit klinisch im Einsatz sind (Caramoy, Schroder et al. 2010).

Tabelle 2: Physikochemische Eigenschaften verschiedener Siluron Öle

| Physikochemische Eigenschaften Siluron-Öle | | | | |
|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------------------|--|
| Eigenschaft | Siluron 1000 | Siluron 5000 | Siluron 2000 | Siluron Xtra |
| Dichte [g/cm ³] 25 °C | 0,97 | 0,97 | 0,97 | 0,97 |
| Viskosität [mPas] 25 °C | 900 - 1200 | 4800 - 5500 | 2000 - 2400 | 4100 - 4800 |
| Brechungsindex | 1,404 | 1,404 | 1,404 | 1,404 |
| Löslichkeit in Wasser | nicht mischbar | nicht mischbar | nicht mischbar | nicht mischbar |
| Zusammensetzung [w %] | 100 % Polydimethylsiloxan | 100 % Polydimethylsiloxan | 95 % Siluron 1000 + 5 % 2,5 Mio. mPas | 90 % Siluron 1000 + 10 % 2,5 Mio. mPas |
| Elastizität [Jε ³] [Pas] | 2 x 10 ⁻⁵ | 1 x 10 ⁻⁵ | 6,5 x 10 ⁻⁴ | 1,4 x 10 ⁻³ |
| Scherviskosität (bei 8,37 s ⁻¹ , 37 °C) [mPas] | 931 | 4303 | 1800 | 4377 |
| volatile Bestandteile (200 °C, 24 h) [%] | ≤ 0,2 % | ≤ 0,2 % | ≤ 0,2 % | ≤ 0,2 % |

Quelle: Caramoy A., Hagedorn N., Fauser S., Kugler W., Gross T., Kirchhof B.: Development of emulsification-resistant silicone oils: can we go beyond 2000 mPas silicone oil? Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011; 52: 5432-5436

(Caramoy, Hagedorn et al. 2011) Tabelle aus der Fluoron Broschüre: Siluron, Hochreine Silikonöle zur intraokularen Anwendung (Fluoron 2015)

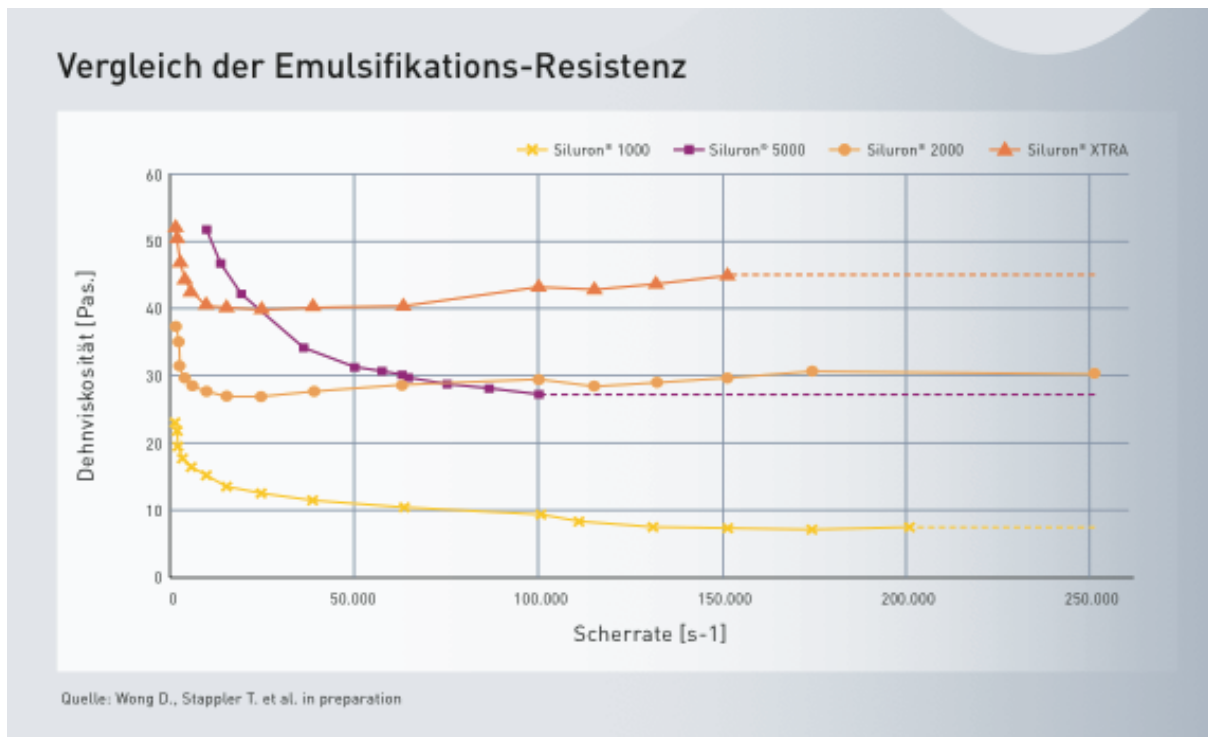
Tabelle 2 führt die Zusammensetzung 4 verschiedener Öle der Firma Fluoron auf.

Die Öle zeigen alle eine konstante Dichte, den gleichen Brechungsindex und Anzahl volatiler Bestandteile. Sie sind nicht in Wasser löslich. Das hier untersuchte Silikonöl Siluron Xtra[®] zeigt eine ähnlich hohe Viskosität und Scherviskosität wie das Siluron 5000[®] die beide bis zu 4 mal visköser sind als die Silikonöle Siluron 1000[®] und Siluron 2000[®]. Im Gegensatz zu Siluron 5000[®] hat Siluron Xtra[®] eine deutlich höhere Elastizität als die Vorläufer Produkte.

Diese hohen elastischen und viskosen Eigenschaften von Siluron Xtra[®] lassen sich durch dessen Zusammensetzung erklären.

Im Vergleich zu den älteren Ölen Siluron 1000[®] und Siluron 5000[®], die aus 100% Polydimethylsiloxan bestehen, sind die neuen Öle Siluron 2000[®] und Siluron Xtra[®] aus einer Mischung extrem langkettiger Moleküle mit einer Viskosität im Bereich von 2.500.000 mPas und kurzkettigen Molekülen mit einer Viskosität im Bereich von 1.000 mPas zusammengesetzt, wobei das neue Siluron Xtra[®] 5% mehr langkettige Moleküle besitzt.

Tabelle 3: Vergleich der Resistenz gegenüber Emulsifikation

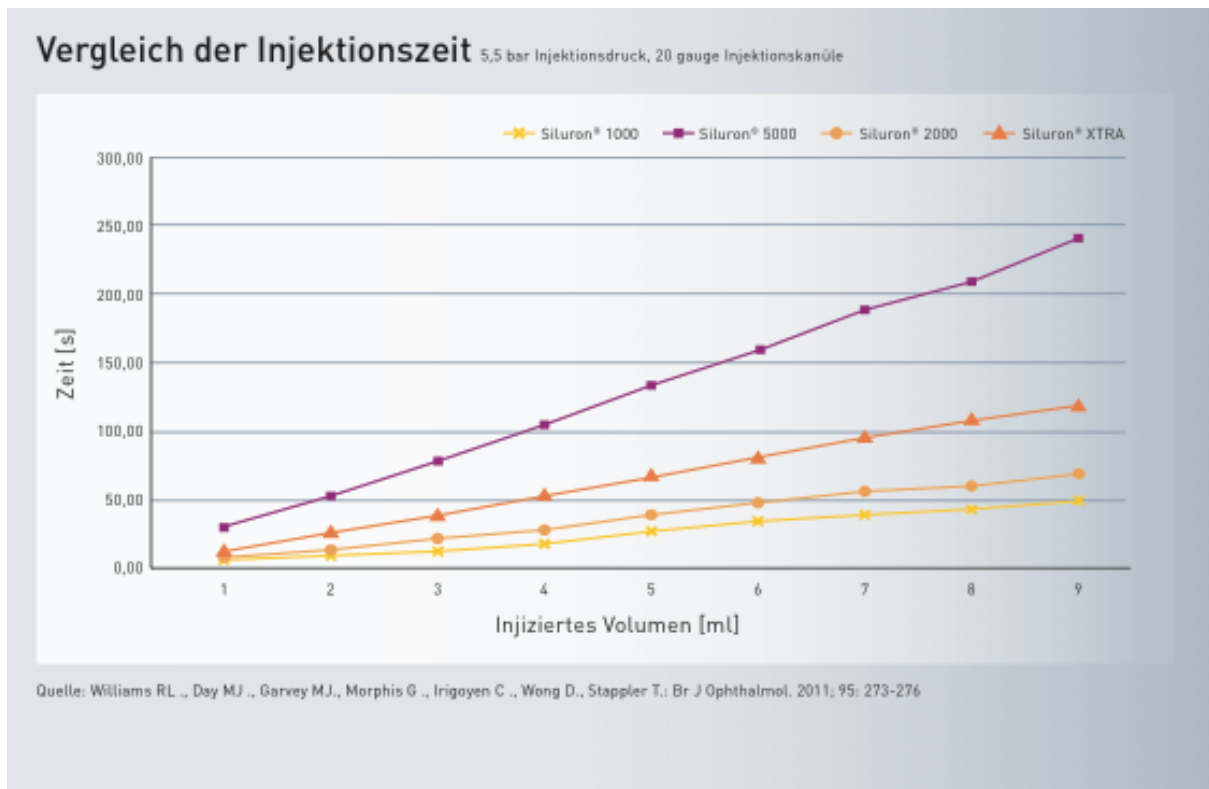


(Wong, Van Meurs et al. 2005) Tabelle aus der Fluoron Broschüre: Siluron, Hochreine Silikonöle zur intraokularen Anwendung (Fluoron 2015)

Die Tabelle 2 zeigt die Veränderung der Dehnviskosität der verschiedenen Öle bei Zunahme der Scherrate.

Durch ihre besondere Molekülkettenkonstellation sind Siluron 2000[®] und Siluron Xtra[®] in der Lage ihre Viskosität den permanenten Scherkräften im Auge anzupassen. Bei den herkömmlichen Ölen Siluron 1000[®] und Siluron 5000[®] kommt es durch permanente Scherkräfte von außen zu einem kontinuierlichen Abfall bis zum Erreichen eines niedrigen Plateaus der Viskosität. Die neueren Silikonöle können sich hingegen an die Scherkräfte anpassen. Am leichten Anstieg der Kurven von Siluron 2000[®] und Siluron Xtra[®] im Verlauf zeigt sich, dass sich bei höherer Einwirkung der Scherkräfte die Viskosität der Öle erhöht, d.h. umso resistenter sind sie gegen Emulsifikation. Das Silikonöl Siluron 2000[®] zeigt auch in der klinischen Verwendung gute Ergebnisse und führt nur selten zu früher Emulsifikation im Patientenauge nach PPV mit Silikonöltamponade (Maier, Engelmann et al. 2011).

Tabelle 4: Vergleich der Injektionszeit der Silikonöle ins Auge



(Williams, Day et al. 2011) Tabelle aus der Fluoron Broschüre: Siluron, Hochreine Silikonöle zur intraokularen Anwendung (Fluoron 2015)

Tabelle 3 stellt das injizierbare Volumen an Silikonöl pro Sekunde dar. Durch ihre unterschiedlichen Zusammensetzungen lassen sich die verschiedenen Silikonöle mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten ins menschliche Auge injizieren. Übergreifend lässt sich feststellen, dass die Injektionszeit proportional zum injizierten Volumen zunimmt.

Höhere Viskosität verlangsamt durch die Zähigkeit der Flüssigkeit die Injektion.

Entsprechend zeigt sich in Tabelle 4 eine rasche Injektionsgeschwindigkeit der niedrig viskosen Öle Siluron 1000® und Siluron 2000®, wohingegen das hochviskose Siluron 5000® eine deutlich langsamere Injektionsgeschwindigkeit aufweist.

Vorteil des neuen Siluron Xtra® ist seine, trotz hoher viskoser Eigenschaften, relativ schnelle Injektionszeit. Dies ermöglicht es dem Öl auch bei kleineren Inzisionen und sehr schmalen Injektionskanülen gut und zügig injiziert zu werden (Chan, Ng et al. 2011).

5 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es erstmals experimentell am porkinen Tiermodell die Verträglichkeit des Silikonöls Siluron Xtra® auf die Netzhaut zu untersuchen.

Nachdem sich Silikonöle im klinischen Gebrauch als gut verträglich erwiesen haben, war der Untersuchung von besonderem Interesse, die Verträglichkeit des Öls auch auf histologischer und immunhistochemischer Ebene zu evaluieren.

Es sollte geprüft werden ob es zu strukturellen Beeinträchtigungen der Netzhaut durch das Silikonöl kommen kann. Sowohl mikroskopisch in HE Schnitt gefärbten Präparaten, als auch mit immunhistochemischer GFAP Markierung wurde nach Beschädigungen in den Netzhautstruktur, insbesondere in den Müller'schen Stützzellen, gesucht.

Es stellte sich die Frage, ob im Zusammenhang mit dem Silikonölkontakt Proliferationsvorgänge in der Netzhaut ausgelöst werden können. Proliferationen sind ein Hinweis auf laufende Reparaturmechanismen und wären somit eine Reaktion auf Beschädigungen der Netzhaut, die durch das Silikonöl verursacht sein könnten. Proliferationen wurden im Gewebe mit Hilfe des Ki67 Markers immunhistochemisch dargestellt.

Silikonöltamponaden werden im menschlichen Auge häufig auch bei Netzhautrissen eingesetzt und somit kann Silikonöl durch die Risse auch in direkten Kontakt mit RPE kommen. Deshalb wurde neben der Verträglichkeit des Silikonöls auf die Netzhaut in dieser Arbeit auch die Verträglichkeit des Öls auf das RPE histologisch und immunhistochemisch untersucht.

Es wurde außerdem die Verwendung von ex vivo porkinem Netzhautgewebe im Perfusionssystem über einen Zeitraum von 4-7 Tagen untersucht, welches durch verschiedene Faktoren, wie der post mortem Zeit der Präparate, Präparationsbeschädigungen, möglicher bakterieller Infizierung und Luftblasen im Perfusionssystem beeinflusst sein kann.

6 Material und Methoden

Der experimentelle Ablauf dieser Untersuchung beinhaltete im ersten Schritt eine präzise Präparation der Schweineaugen um NH und RPE freizulegen.

Die NH Präparate wurden mit Silikonöl bedeckt und in speziellen Perfusionskammern (Minucells und Minutissue, Bad Abbach, Deutschland) eingespannt.

In den Kammern wurden die Präparate mit Hilfe eines Pumpsystems gleichmäßig über mehrere Tage mit DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Medium) Nährmedium umspült. Im Anschluss wurden die Präparate fixiert und zur histologischen Beurteilung unterm Lichtmikroskop mit HE gefärbt. Für eine detailliertere Auswertung der Gewebe wurden immunhistochemische Färbungen mit den Immunmarkern GFAP und Ki67 durchgeführt.

6.1 Präparation von Netzhaut-Sheets

Für die Durchführung der folgenden Experimente wurden 37 frische Schweinebulbi verwendet. Diese wurden vom Schlachthof (Münchner Schlachthof Betriebs GmbH, München, Deutschland) in 0,9% NaCl gekühlt abgeholt und standen innerhalb 20-30 Minuten post mortem im Labor zur Verfügung. Die Bulbi wurden gesäubert, Muskelreste mit einer Eukleationsschere entfernt und dann wieder in steriler 0,9% NaCl Lösung oder PBS aufbewahrt.

Die Bulbi wurden bei sterilen Bedingungen unter einem Operationsmikroskop (Zeiss universal S3, Jena, Deutschland) präpariert.

Dazu wurde ein Bulbus mit einer sterilen Einmal-Injektions-Kanüle durch den abgeschnittenen Sehnerv an einer Styroporplatte fixiert (*Abbildung 5*).

Mit dem Skalpell wurde der Augapfel im Bereich der Pars plana, am Übergang von Hornhaut zu Sklera, eröffnet. Mit Hilfe einer Eukleationsschere wurde dann das vordere Hornhautsegment mit Hornhaut, Linse und Iris kreisrund herausgeschnitten. Durch sanften Zug war es möglich, beim Herausziehen der vorderen Augensegmente den gesamten Glaskörper mit seiner Grenzmembran herauszulösen ohne dabei die Netzhaut zu beschädigen.

Verbliebene Glaskörperreste wurden vorsichtig mit trockenen Zigarettentupfern aus dem Inneren des Bulbus herausgelöst.

Der restliche Bulbus wurde durch den Sehnerven hindurch mit einer Schere halbiert. Die größere Hälfte wurde mit 3 Kanülen auf einer sterilen Kompresse, auf der

Styroporplatte, mit der Netzhaut oben gerichtet, möglichst flach und gespannt fixiert. Die andere Hälfte wurde als Reserve in 0,9% NaCl oder PBS getrennt gelagert.

Während der Präparation wurde der Bulbus regelmäßig mit 0,9% NaCl oder PBS benetzt um das Austrocknen des Präparates zu verhindern.

Um den sphärischen Bulbus zu glätten wurden entlang der Schnittlinie des halbierten Bulbus mit dem Skalpell kleine Einschnitte unterhalb von Netzhaut und Pigmentepithel in einem Abstand von 1-2 mm in die Sklera geschnitten. Somit wurde die gespannte sphärische Struktur des Bulbus gelockert und konnte ganz flach an die Styroporplatte angelegt und fixiert werden.

Von lateral wurde dann mit einer feinen, gezahnten Pinzette die Netzhaut und das Pigmentepithel vorsichtig von der Sklera abgehoben und gleichzeitig mit einem Skalpell die Aderhaut und Gefäßverbindungen zwischen Sklera und Pigmentepithel durchtrennt.

Wenn ca. $\frac{3}{4}$ des Häutchens aus Retina und Pigmentepithel von der Sklera gelöst waren, konnte man beginnen, den unteren, weißen Ring des Minusheets (Minucells und Minutissue, Bad Abbach, Deutschland) mit Hilfe einer kleinen, ungezahnten Pinzette unter das Häutchen zu schieben. Der Minucell Gewebeträger besteht aus 2 Kunststoffringen. Auf den kleineren, weißen Ring wird das Gewebe flach aufgelegt. Der größere, schwarze Ring wird darüber gestülpt und behutsam auf das Gewebe und den unteren Ring gepresst um die Netzhaut einzuspannen. Der weiße Ring musste komplett von Retina und Pigmentepithel bedeckt sein und vorsichtig straff gezogen werden um Falten im Gewebe zu glätten. Sehr vorsichtiges Arbeiten war erforderlich um Verletzungen an der sehr empfindlichen Netzhaut zu vermeiden. Auf den von Gewebe bespannten weißen Ring wurde dann der obere, schwarze Ring des Minusheets mit einem äußeren Durchmesser von 13 mm und einem inneren Durchmesser von 9 mm, vorsichtig, mit Hilfe von ungezahnten Pinzetten, angedrückt. Dabei war zu beachten, dass die Ringe nicht zu fest ineinander gedrückt wurden, da es sonst zu einem Stanzeffekt kommen konnte und die Netzhaut dabei zerquetscht werden konnte. Die in einander geklemmten Ringe wurden sorgfältig mit einer Schere in zirkumferentiellen Schnitten vom restlichen, anhängenden Gewebe befreit und in einer Sterilisationsbank in die einzelnen Perfusionskammern gelegt. Auf die Präparate der Versuchsgruppen V1 und V3 wurde ein großer Tropfen Silikonöl direkt auf die Netzhaut bzw. in V3 direkt auf das RPE gegeben, der das gesamte Gewebe

bedeckt hat. Die Kammern wurden im nächsten Schritt unter der Abzugshaube verschlossen und an Perfusionsschläuche angeschlossen.

Die post mortem Zeit zwischen Transport der Augen vom Schlachthof und der Präparation, bis zur Einbettung in Medium, wurde für alle Präparate dokumentiert und betrug durchschnittlich 2.5 Stunden.

Die folgende Abbildung zeigt die einzelnen Schritte der Bulbuspräparation und das Einspannen der Netzhaut in einen Minucellring.

Präparation des Bulbus

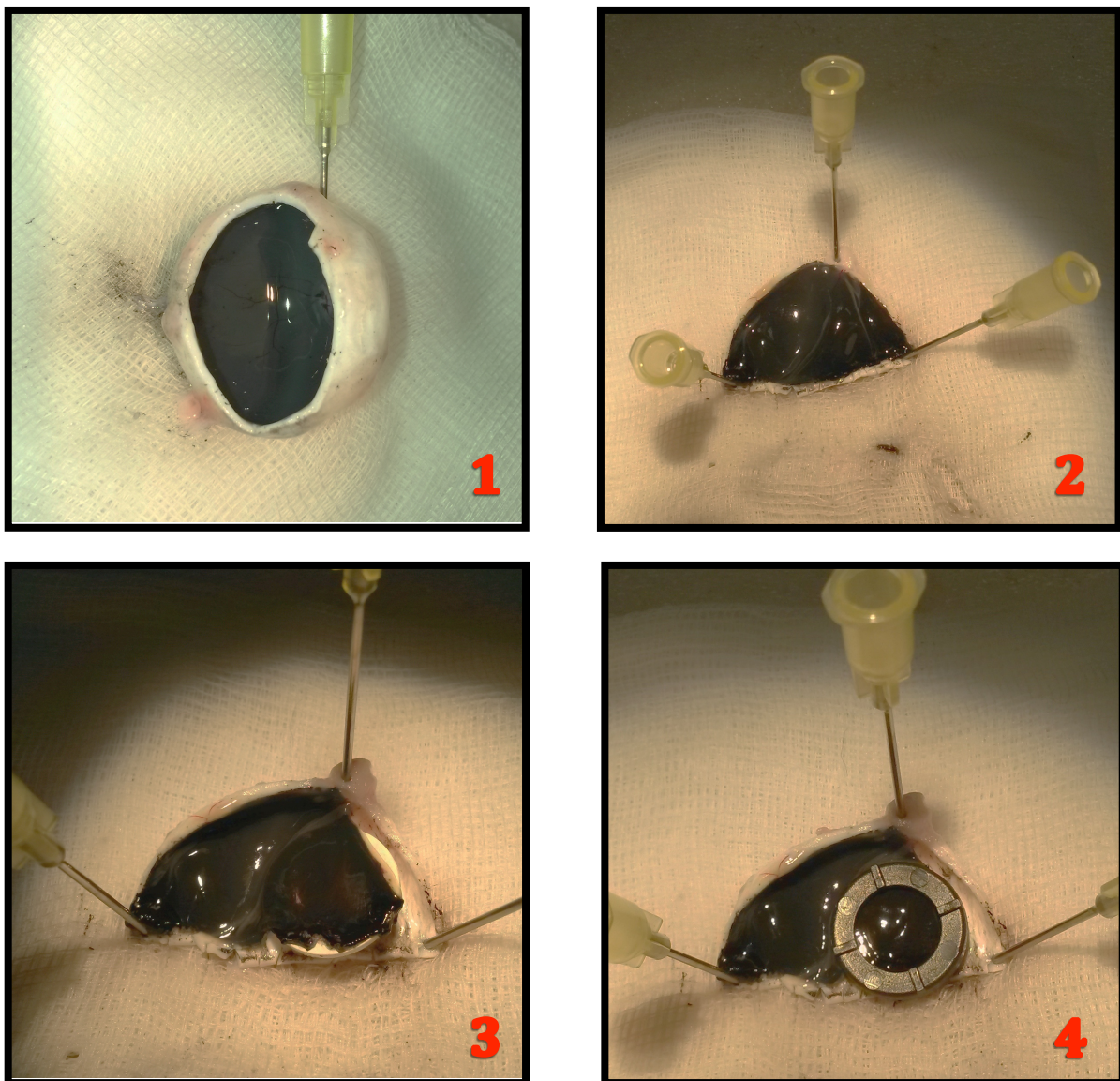


Abbildung 5

Eröffnung des Bulbi und Enukleation (1). Halbieren des Bulbi und Fixierung (2). Lösen der Netzhaut und RPE von der Sklera und unterschieben des weißen Minucell Rings (3). Einspannen des Netzhautgewebes zwischen den oberen (schwarzen) und unteren (weißen) Minucell Ring (4).

Für die Untersuchung wurden die Präparate in 3 verschiedene Versuchsgruppen unterteilt die in Tabelle 5 dargestellt sind. In Gruppe 1 und 2 wurde Netzhaut und retinales Pigmentepithel (RPE) verwendet, wobei Gruppe 1 für die Perfusion mit Siluron Xtra[®] beschichtet wurde und Gruppe 2, als Kontrollgruppe, ohne Silikonöl perfundiert wurde.

In Versuchsgruppe 3 wurde nur RPE verwendet, welches mit Siluron[®] beschichtet perfundiert wurde.

Tabelle 5 : Einteilung der Versuchsgruppen

| Versuchsgruppe | Verwendetes porkines Gewebe | Siluron Xtra [®] | Anzahl der Präparate |
|--------------------|-----------------------------------|---------------------------|----------------------|
| 1 | Retina + retinales Pigmentepithel | ja | 23 |
| 2 (Kontrollgruppe) | Retina + retinales Pigmentepithel | nein | 7 |
| 3 | Retinales Pigmentepithel | ja | 7 |

Perfusionskultur der Netzhaut

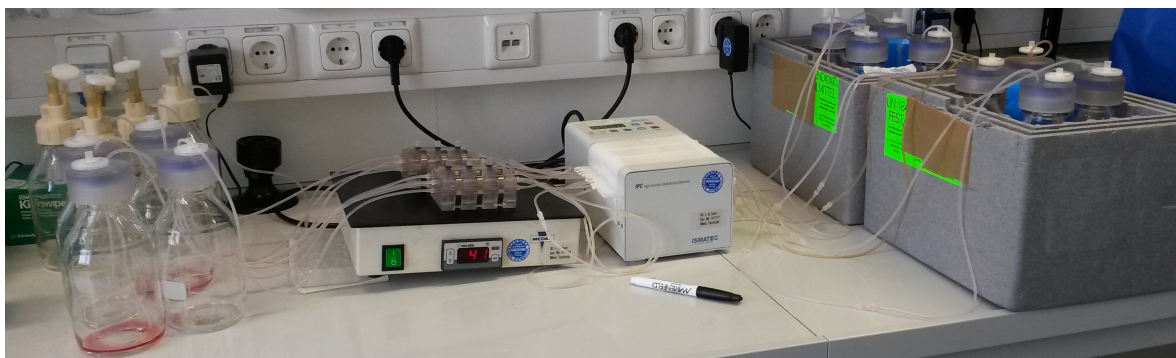


Abbildung 6

Es wurden sowohl Einzel- als auch 6-er Minucell Kammern, mit je 3 hintereinandergeschalteten Kammern, für die Perfusionen verwendet. Das Konstrukt bestand aus einer Gradienten-Perfusionslinie mit 2 identischen Perfusionslinien, eine oben und eine unten welche die Kammern gleichmäßig perfundierten. Diese waren über je drei 50 cm lange Silikonschläuche mit einem Durchmesser von 1,02 mm an je zwei 500 ml Schottflaschen befestigt durch welche frisches Medium mit Hilfe einer Pumpe bei einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 3 ml/Std. durch die Perfusionskammer hindurch floss und das verbrauchte Medium danach in die leeren Schottflaschen, am anderen Ende des Perfusionskonstruktes, entleert wurde. Die Flaschen mit frischem Medium wurden mit Eis gekühlt, wohingegen die Perfusionskammern auf einer Heizplatte mit 41°C erwärmt wurden. Die Heizplatte wurde leicht schräg gestellt um einen besseren Perfusionsgradienten zu erzielen.

Für das Medium wurde ein Gemisch aus DMEM Medium, 15% sterilem porcinen Serum, 1% Penicillin Streptomycin und 2,5% HEPES Pufferlösung verwendet welches unter einer Sterilisationsbank zusammengesetzt wurde.

Die Perfusionsdauer betrug je nach Versuch zwischen 4-8 Tage. Der regelmäßige Durchfluss des Mediums sowie mögliche Luftbläschenbildung wurde während der Perfusionszeit mindestens 2x täglich kontrolliert und dokumentiert.

Nach Beendigung der Perfusion wurden die Ringe mit den NH Präparaten in der eröffneten Kammer unterm Operationsmikroskop betrachtet um mögliche Schäden während der Perfusion auszuschließen und um zu kontrollieren ob das Silikonöl noch regelrecht auf den Präparaten auflag.

6.2 Reinigung und Abbau der Perfusionsmaterialien

Um die Wiederverwendung der Perfusionskammern, Schläuche und Flaschen zu ermöglichen war eine gründliche Reinigung der Materialien unmittelbar nach Beendigung der Perfusionen notwendig.

Nach Entnahme der Netzhautpräparate wurden sämtliche Materialien für 30 Minuten in 1% Incidin Lösung eingelegt. Danach wurden die Perfusionslinien der Kammern und die Silikonschläuche mit Hilfe eines Dreiwegehahns an einer 10 ml Spitze befestigt und nacheinander mit Ethanol, dann Leitungswasser durchgespült und zum Schluss mit einer Luft gefüllten Spitze zum Trocknen durchgepustet.

Alle verwendeten Materialien wurden ausgewaschen und getrocknet und vor Gebrauch sterilisiert und eingeschweißt.

7 Histologische Bearbeitung

7.1 Fixierung und Paraffineinbettung

Nach Beendigung der Perfusionen wurden die Netzhautpräparate im Minucell Gewebeträger aus den Perfusionskammern genommen und in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Die Gewebeproben wurden über Nacht im Kühlschrank gelagert um zu fixieren. Nach Einbettung von mindestens 24 Stunden in 4% PFA wurden die Doppelringe geöffnet und mit Hilfe eines Tunnelmesser und einer Pinzette wurde das Netzhautgewebe aus den Minucellringen heraus gelöst (*Abbildung 7*). Auf einer mit gehärtetem Paraffin gefüllten Petrischale wurde das Gewebe mit einer Rasierklinge in eine Trapezform geschnitten (*Abbildung 8*). Die Gewebeproben wurden in 4% PFA getränkt und, geschützt von dünnen Papiertüchern, in beschrifteten Histokassetten eingeschlossen (*Abbildung 9*), aufbewahrt und zur Pathologie transportiert. Im pathologischen Institut des Klinikums Rechts der Isar wurden die Proben über Nacht in einen Einbettautomaten gelegt um am Folgetag an einer Paraffinausgießstation zu Paraffinblöcken ausgegossen und getrocknet zu werden (Romeis, Mulisch et al. 2010).

Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden die Paraffinblöcke in dünne Schichten geschnitten und auf einem Objektträger fixiert. Diese wurden später unter dem Lichtmikroskop betrachtet und histologisch ausgewertet (Romeis, Mulisch et al. 2010).

Fixierte Netzhaut aus dem Minucell Gewebeträger gelöst



Abbildung 7

Zuschneiden des Präparates in Trapezform

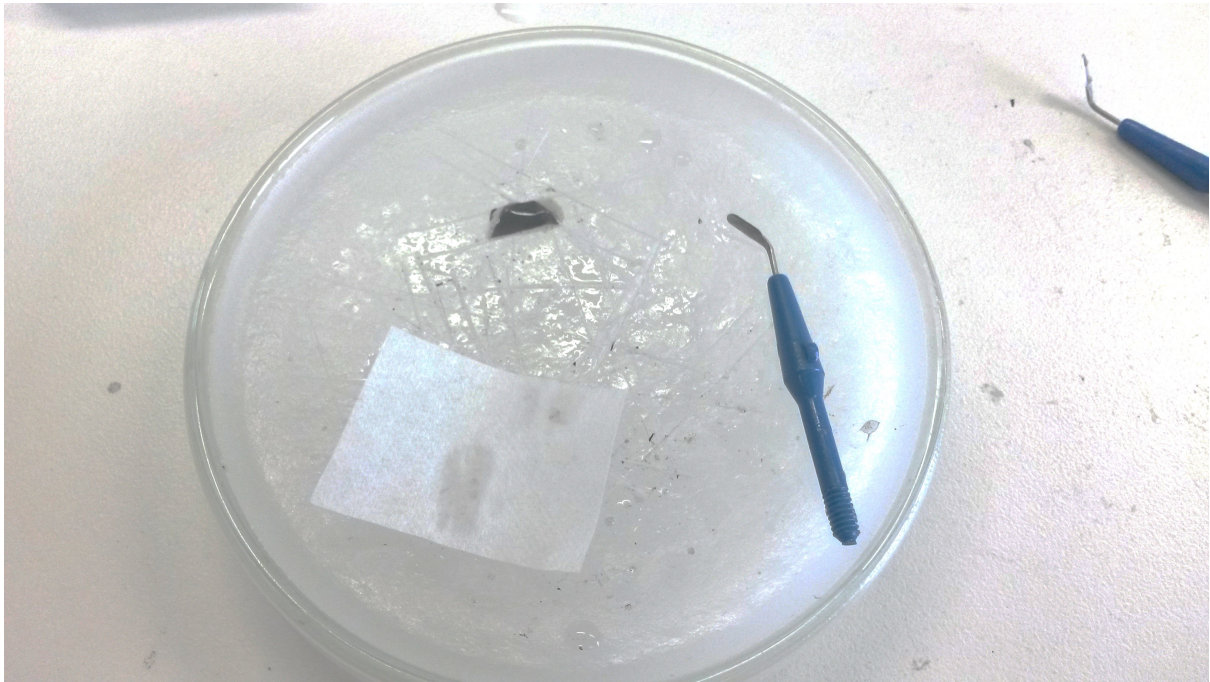


Abbildung 8

Einschließen des Präparates in einer Histokassette



Abbildung 9

7.2 HE Färbung der Paraffinschnitte

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine der wichtigsten und gängigsten Färbemethoden in der Histologie und lässt sich besonders gut bei Paraffinschnitten anwenden. Die Färbung dient vor allem der Unterscheidung von Zellkernen und Zytoplasma und wurde für diesen Versuch als Übersichtsfärbung verwendet.

Hämatoxylin ist eine Farbvorstufe die sich durch Oxidation an der Luft in Hämatein umwandelt. Dieses bildet mit Aluminium Ionen den basischen Farbstoff Hämalaun. Der Farbstoff Hämalaun ist positiv geladen und bindet bevorzugt an basophile, negativ geladene Strukturen und färbt diese blau, z.B. die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA in den Zellkernen (Romeis, Mulisch et al. 2010).

Eosin ist ein negativ geladener Farbstoff und bindet somit bevorzugt an azidophile, positiv geladene Strukturen, wie die positiv geladenen Proteine des Zytoplasmas oder extrazytoplasmatische Strukturen wie Kollagen, und färbt diese rot. Die mit Hämalaun angefärbten Präparate werden mit Eosin überfärbt. Der Färbevorgang wird bei gewünschter Farbstärke durch Wasser gestoppt (Romeis, Mulisch et al. 2010).

Die einzelnen Schritte der Entparaffinierung und HE Färbung werden in Tabelle 16 im Anhang aufgeführt.

7.3 Immunhistochemische Färbung der Paraffinschnitte

Die immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten ermöglicht die Visualisierung von Gewebe- bzw. Zellantigenen oder Proteinen.

Ein primärer Antikörper bindet zunächst am gesuchten Substrat. Dieses wird jedoch erst durch die Anbindung von Sekundärantikörpern sichtbar gemacht, welche kovalent mit mehreren Molekülen des Enzyms Horseradish-Peroxidase (HRP) verbunden sind.

Erst über eine darauf folgende Enzym-Substrat-Reaktion mit einer farbgebenden Komponente (AEC) wird die Bindungsstelle zwischen Antigen und Antikörper durch eine Katalase Reaktion mit Peroxidase sichtbar gemacht.

Die Paraffinschnitte werden im ersten Schritt zunächst entparaffiniert und rehydratisiert.

Durch Inkubation in 3%iger H₂O₂ Lösung ("Peroxid-Block") wird endogene Peroxidase im Gewebeschnitt, die zu unerwünschter Hintergrundfärbung führen kann, inaktiviert.

Das Gewebe wird nacheinander in dem spezifischen, primären Antikörper, sekundären Antikörper und HRP Konjugat inkubiert, wobei ein Waschvorgang mit PBS nach jeder Inkubation erfolgt. Im letzten Färbeschritt wird durch die Zugabe einer Chromogenlösung (AEC) eine enzymatische Reaktion mit der Peroxidase gestartet. Hierdurch ergibt sich eine Anfärbung des Gewebes am Ort der Bindung des primären Antikörpers. Das verwendete Chromogen AEC bildet am Ort der Bindung des Primärantikörpers eine rotbraune Farbe welche unter dem Lichtmikroskop sichtbar ist. (Quelle: ZytoChem-Plus Gebrauchsanweisung HRP Polymer Kit (Unbekannt 2013))

Die einzelnen Schritte der immunhistochemischen Markierung der Schnitte werden in Tabelle 17 im Anhang aufgeführt.

7.4 GFAP

GFAP (Glial fibrillary acidic protein) ist ein Protein welches als Intermediärfilament im zentralen Nervensystem und unter anderem auch in den Nervenfasern und Ganglionzellen der gesunden Retina exprimiert wird.

In vorausgegangen Versuchen hat sich gezeigt, dass eine positive GFAP Anfärbung der Ganglionzellen der Norm entspricht, die Müller'schen Stützzellen (MC) in der gesunden Retina hingegen aber nicht angefärbt werden (Lewis und Fisher 2003). GFAP konnte als wichtiger Mitspieler bei Reparaturvorgängen nach Verletzungen im zentralen Nervensystem gezeigt werden (Eng, Ghirnikar et al. 2000, Hol und Pekny 2015). Im Zusammenhang mit retinalen Gliosen wurde eine starke Zunahme von GFAP beobachtet die zu einer Anfärbung der MC geführt hatte. Es wird eine positive Korrelation zwischen der Intensität der immunhistochemischen Färbung, ihrer anatomischen Lage und dem Grad der retinalen Veränderungen vermutet (Tuccari, Trombetta et al. 1986).

Darüber hinaus besteht auch ein Zusammenhang zwischen GFAP Expression und instabilen bzw. beschädigten Müller'schen Stützzellen (Li, Sheedlo et al. 1993).

Alle Schnitte wurden immunhistologisch mit GFAP angefärbt, lichtmikroskopisch untersucht und digitalfotographisch dokumentiert. Ziel war der Nachweis von

angefärbtem GFAP im Bereich der Müller'schen Stützzellen, als Nachweis von Beschädigungen bzw. akuter Reparaturmechanismen an der Netzhaut.

7.5 Ki67

Bei dem Ki-67 Antigen handelt es sich um ein Protein welches vom MKI67 Gen kodiert wird (Schonk, Kuijpers et al. 1989). Es ist ausschließlich in proliferierenden Zellen vorhanden (Bullwinkel, Baron-Luhr et al. 2006). Auf Grund des Vorkommens von Ki-67 in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G1, S, G2, Mitose), bis auf die ruhende Phase (G0), eignet sich das Protein hervorragend als Marker zur Bestimmung von Zellproliferation (Scholzen und Gerdes 2000). Die Funktion von Ki-67 ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Es konnte jedoch an Stellen der ribosomalen RNA Synthese festgestellt werden, weshalb eine Rolle des Proteins in der frühen rRNA Synthese vermutet wird (Bullwinkel, Baron-Luhr et al. 2006).

Alle Schnitte wurden immunhistologisch mit dem Ki-67 Antigen angefärbt um mögliche Zellproliferationen in der Retina und dem retinalen Pigmentepithel nachzuweisen.

8 Auswertung

Für die Auswertung der Präparate wurden Ausschnitte der Netzhäute in 20-facher Vergrößerung unterm Lichtmikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet. Die Ausschnitte wurden mit einer Kamera fotografiert (Canon, Tokio, Japan) und am Computer mit dem Fotobearbeitungsprogramm iPhoto (Apple, Kalifornien, USA) bearbeitet.

Bei positivem GFAP färben sich die MC rot.

Proliferationsherde werden in der Ki67 Färbung von AEC ebenfalls rot angefärbt. Für die Ki67 Auswertung wurden die Anzahl der Proliferationsherde mit Hilfe eines Rasters in den Ausschnitten durchgezählt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Statistik Software SPSS 22 (IBM Corporation). Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wurde der nichtparametrische Mann-Whitney U Test verwendet wobei $p=0,05$ als signifikant gewertet wurde.

GFAP negative

vs.

GFAP positive Färbung

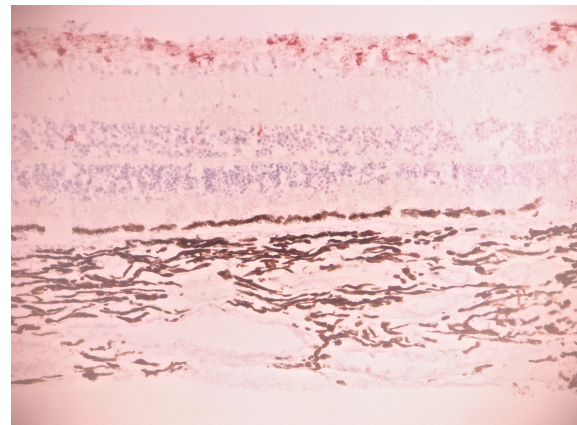
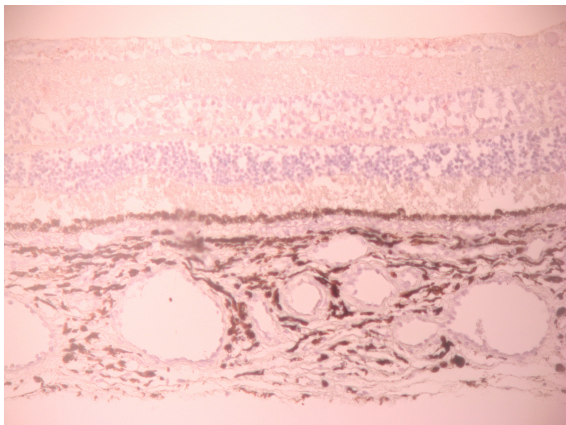


Abbildung 10

Zählraster für Proliferationsherde in Ki67 Färbung

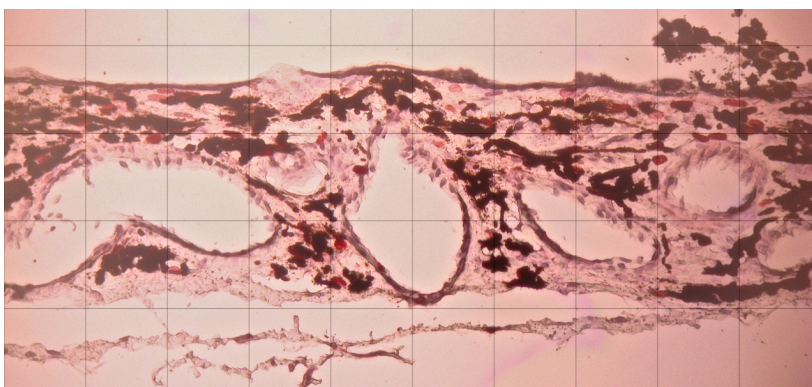


Abbildung 11

9 Ergebnisse

9.1 Gewebepräparation, Perfusion und Bearbeitung

Für die Durchführung dieser Arbeit wurden insgesamt 37 Schweineaugen präpariert. Diese wurden in 6 separaten Durchläufen mit einer Dauer von minimal 4 bis maximal 8 Tagen mit einem gekühlten Mediumgemisch perfundiert. Im ersten Durchlauf wurden jeweils 2 Einzelkammern verwendet. Die darauf folgenden Perfusionen wurden in 6er Kammern durchgeführt, da sich im Laufe der Versuchsdurchführung zeigte, dass die 6er Kammern zu weniger Luftbläschenbildung während der Perfusion neigten.

Die Präparate wurden in 3 Versuchsgruppen unterteilt (Tabelle 5).

24 Netzhautpräparate wurden mit Siluron Xtra[®] bedeckt (Versuchsgruppe 1) perfundiert, 7 Präparate wurden als Kontrollen ohne Siluron Xtra[®] (Versuchsgruppe 2) und 7 Präparate ohne Netzhaut bzw. RPE mit Siluron Xtra[®] bedeckt (Versuchsgruppe 3). Bei der Präparation kam es bei 8 von 37 Präparaten zu kleinen Beschädigungen in Form von Rissen in der Netzhaut, die nach der Perfusion jedoch keine Vergrößerung zeigten und im weiteren Verlauf beim Zuschneiden der Präparate für die Paraffinschnitte herausgeschnitten werden konnten.

Nach der Perfusion war eine eindeutige Ölschicht auf den NH+S und RPE+S Präparaten aufliegend sichtbar, die sich zusätzlich beim Einbetten der Ringe in PFA löste und auf Grund der geringeren Dichte von Öl zu Wasser, an die Oberfläche schwamm. Somit konnte gezeigt werden, dass das Silikonöl während der Perfusion auf der Netzhaut bzw. dem RPE auflag (Abbildung 18 und 19)

Beim Zuschneiden der Präparate für die Paraffinschnitte kam es bei 6 Netzhautpräparaten und 2 der Kontrollpräparaten zum irreparablen Kollaps der Netzhäute welche deshalb nicht mehr für die HE und GFAP Auswertung benutzt werden konnten. Keine der RPE + Siluron Xtra[®] Präparate wurden beschädigt. Das RPE der beschädigten Präparate konnte jedoch in den meisten Fällen erhalten und paraffiniert werden und zur Beurteilung der Ki67 Färbung genutzt werden, da sich die Ki67 Markierung bzw. Proliferation nur im RPE der Präparate nachweisen ließ.

Die fertigen histologischen Schnitte wurden alle unter dem Lichtmikroskop in 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung betrachtet und fotografiert. Am Computer wurden die Bilder dann einheitlich weiter mit dem Bildbearbeitungsprogramm von iPhoto bearbeitet und ausgewertet.

9.2 Strukturelle Beurteilung in HE Färbung

Zur Auswertung der Präparate in HE Färbung wurde die Struktur der Netzhaut aus VG 1 mit den Kontrollpräparaten aus VG 2, ohne Silikonöl, am Lichtmikroskop verglichen. Es wurde das RPE aus allen 3 VGs miteinander verglichen.

Es zeigte sich in allen Versuchsgruppen überwiegend eine intakte Architektur der Netzhaut und des RPE. Die innere Netzhaut zeigte weder in den Kontrollgruppen noch bei Siluron Xtra® Zugabe eine sichtbare Beschädigung in der HE Färbung. Auch der Vergleich der RPE zeigte in allen 3 Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede in der HE Färbung.

Das RPE zeigte in einigen Präparaten aus den VG 1 und VG 2 auf dem Objektträger eine Ablösung von der NH.

In VG 1 und VG 2 konnte außerdem bei einigen Präparaten ein Zusammenziehen der äußeren Körnerschicht auf Grund der Vertrocknungsvorgänge während der Fixierung erkannt werden.

Unabhängig von der Versuchsgruppe war die Basalmembran des RPE in einigen Präparaten durchbrochen und strukturell beschädigt.

Intakte NH und RPE in HE Färbung nach Perfusion mit Siluron Xtra®

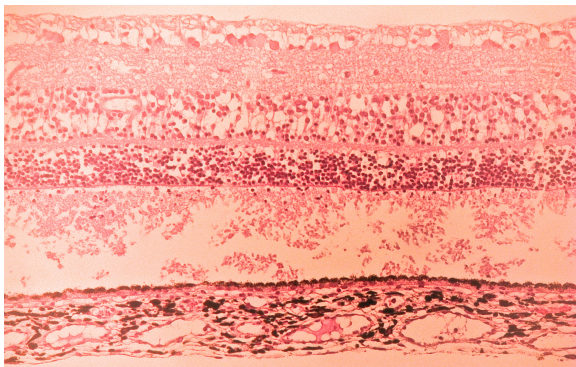


Abbildung 12 Ausschnitt der NH mit RPE aus VG1 in 40-facher Vergrößerung, HE Färbung

9.3 Immunhistochemische Marker

Bei der GFAP immunhistochemischen Färbung wurden als Hinweis auf eine mögliche Beschädigung MC positiv angefärbt.

71% der Präparate aus VG 1 zeigten eine positive MC Markierung. Von den Kontrollen in VG 2 zeigten 80% eine positive MC Markierung.

Die Präparate aus VG 3 nahmen auf Grund der fehlenden NH, in der sich die MCs befinden, keine Farbe an. Die GFAP Expressionen waren nicht signifikant erhöht ($p=0,9$).

Die Ki67 Immunhistochemische Färbung ist ein Hinweis auf Proliferationsvorgänge im angefärbten Gewebe. Insgesamt zeigten 33% der Präparate aus VG 1 Proliferation im Gewebe. In den Kontrollpräparaten aus VG 2 und in VG 3 waren in jeweils 86% der Präparate Proliferationen sichtbar.

Die Anzahl der Proliferationsherde im abfotografierten Ausschnitt der histologischen Bilder, in 20-facher Vergrößerung, wurde mit Hilfe eines Zählrasters durchgezählt. Hierbei zeigten sich erheblich Unterschiede in den verschiedenen Gruppen.

Tabelle 6 zeigt die quantitative Auswertung der Proliferationsherde der Präparate in 20-facher Vergrößerung.

Ausprägung der Ki-67 Markierungen

| Versuchsgruppe | Beschreibung | Insgesamt präpariert | Anzahl der verwendeten Präparate für die Ki67 Färbung | Positive Ki67 Proliferation | % |
|----------------|---------------------------------|----------------------|---|-----------------------------|----|
| V1 | NH +RPE + Silikonöl | 23 | 21 | 7/21 | 33 |
| V2 | NH+RPE ohne Silikonöl | 7 | 7 | 6/7 | 86 |
| V3 | RPE + Silikonöl | 7 | 7 | 6/7 | 86 |

Tabelle 6

Die Ergebnisse des Mann-Whitney U Test zeigten bei Verwendung von Siluron Xtra® (VG 1) eine hoch signifikant geringere Anzahl an Proliferationsherden in der Netzhaut als ohne Silikonöl (VG 2) ($p= 0,001$). (Tabelle 7, Tabelle 8)

Die Anzahl der Proliferationsherde bei direktem Kontakt von RPE mit Siluron Xtra® (VG3) entsprach der Proliferation in VG 2, bei intakter Netzhaut über dem RPE und ohne Verwendung von Silikonöl und zeigte keine signifikanten Ergebnisse im Mann-Whitney U Test (p=0,9).

Im Anhang befinden sich die Tabellen mit den Ergebnissen des Mann-Whitney U Test welcher für die statistische Auswertung mit dem Programm SPSS verwendet wurde.

Mann-Whitney U Test: Ki67

Berechnung der statistischen Signifikanz der immunhistochemischen Anfärbung mit Ki67 in VG 1 und VG 2

Ränge

| Type | H | Mittlerer Rang | Summe der Ränge |
|-----------------------|----|----------------|-----------------|
| Ki67 Versuchsgruppe 1 | 23 | 12,85 | 295,50 |
| Versuchsgruppe 2 | 7 | 24,21 | 169,50 |
| Gesamtsumme | 30 | | |

Tabelle 7

Teststatistiken^a

| | Ki67 |
|----------------------------------|-------------------|
| Mann-Whitney-U-Test | 19,500 |
| Wilcoxon-W | 295,500 |
| U | -3,309 |
| Asymp. Sig. (2-seitig) | ,001 |
| Exakte Sig. [2*(1-seitige Sig.)] | ,001 ^b |

Tabelle 8

- a. Gruppierungsvariable: Type
- b. Nicht für Bindungen korrigiert.

Es konnte kein Einfluss der unterschiedlichen post mortem Zeit bis zur Perfusion im Nährmedium (durchschnittlich 2.5 Stunden) auf die Präparate festgestellt werden. Auch für die Perfusionsdauer der Präparate (4 -8 Tage) sowie der Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr, abhängig von der Position der Präparate in 6-er Perfusionskammer, konnte kein Einfluss auf die Ausprägung GFAP oder Ki67 Markierung festgestellt werden.

Zusammenfassend zeigte sich in der Untersuchung der Auswirkung des Silikonöls Siluron Xtra® auf die Biosynthese der Netzhaut, dass die Beschichtung der porkinen Netzhaut ex vivo mit Siluron Xtra® mit einer höchst signifikant geringeren Proliferation im RPE einhergeht als ohne das Silikonöl. Der direkte Kontakt von Silikonöl und RPE zeigte hingegen Proliferationsvorgänge im RPE die mit der Kontrollgruppe vergleichbar waren.

Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Intensität der GFAP Immunreaktion in den Müller'schen Stützzellen und der Verwendung von Siluron Xtra® als Tamponade festgestellt werden.

9.4 Einfluss der Position in der Perfusionskammer und bei der Mediumperfusion

Nach den ersten beiden Perfusionsdurchläufen zeigte sich, dass sich die 6er Kammer Perfusionen besser durchlaufen ließen als die Einzelkammern. Für die darauf folgenden Perfusionen wurden dann entsprechend nur noch 6er Kammern verwendet.

In einer 6er Minucell Kammer sind immer 3 Präparate hintereinandergeschaltet, welche nacheinander mit dem einströmenden, frischen Medium perfundiert werden. Entsprechend erhalten die Präparate in den vorderen Abschnitten eine größere Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr aus dem Medium. Hierdurch lässt sich theoretisch ein relatives Sauer- und Nährstoffdefizit in der Perfusion der Präparate in den hinteren Fächern der Minucell Kammern erwarten.

Beim Vergleich der Präparate die in den vorderen und hinteren Kammerfächern perfundiert wurden zeigen sich jedoch unterm Lichtmikroskop keine strukturellen Unterschiede.

9.5 Luftblasen in den Perfusionsschläuchen und Kammern

Eine der Komplikationen die sich während der Perfusionen ergab, war die Bildung von Luftblasen in den Perfusionsschläuchen mit Fortleitung in die Kammern.

Trotz sorgfältiger Abdichtung aller Übergänge zwischen den Flaschen und Schläuchen war gelegentliche Luftblasenbildung nicht zu vermeiden. Die meisten Bläschen bedeckten die Präparate nur temporär und wurden innerhalb von wenigen Minuten durch den Pumpendruck weitergeschwemmt.

In 4 der 37 Präparate erwiesen sich die Luftblasen jedoch als hartnäckiger und konnten auch durch manuelle Manipulation des Perfusionskonstruktes, durch Änderungen des hydrostatischen Druckes bei vertikaler Umpositionierung der Perfusionsflaschen, nicht aufgelöst und weggeschwemmt werden. Es handelte sich hierbei ausschließlich um einzelne Präparate der VG 1, die deshalb über einen Zeitraum von 24-48 Stunden keine frische Medium Zufuhr erhielten.

Das Vorkommen der Bläschen auf den Präparaten war unabhängig von ihrer Position in der 6er Kammer.

Die Luftblasen haben die Präparate nach der Perfusion vermutlich nicht beeinträchtigt. Die Netzhäute, sowie das Silikonöl, waren nach Eröffnen der Kammern auch in den von Luftblasen beeinträchtigten Feldern noch intakt. Auch in der Auswertung der Präparate unter dem Lichtmikroskop zeigten die 4 Präparate die über mehrere Stunden ohne frisches Medium auskommen mussten keine strukturellen Schäden. Auch die immunhistochemisch gefärbten Schnitte waren unauffällig im Vergleich zu den kontinuierlich mit frischem Medium versorgten Präparaten.

9.6 GFAP Markierung im Zusammenhang mit mechanischen Schäden

Die positiven Anfärbungen der MC mit GFAP in VG 1 und VG 2 wiesen auf Beschädigungen im Netzhautgewebe hin. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Ausprägung der GFAP Expression zwischen VG 1 und VG 2.

10 Diskussion

Die ex vivo Untersuchung des Silikonöls Siluron Xtra[®] auf porkiner Netzhaut zeigte im histologischen Schnitt keine Beschädigung der Netzhaut. Proliferationsvorgänge waren in den Netzhautpräparaten die in Kontakt mit Silikonöl kamen signifikant geringer als in den Kontrollpräparaten ohne Öl. Die experimentell erzielten histologischen Ergebnisse unterstützen somit mehrere vorausgegangene klinische Studien.

10.1 Klinische Ergebnisse von Silikonöl als Endotamponade nach PPV

Die Verwendung von Silikonölen als Endotamponade nach PPV zur Entfernung des Glaskörpers wurde bereits zu Beginn der 60er Jahre von Paul A. Cibis, MD (1911-1955) eingeführt (Petersen 1987, Feibel und Blodi 2013).

In klinischen Studien wurde bereits die Verträglichkeit von Silikonöl als Glaskörperersatzstoff untersucht und erzielte gute klinische Ergebnisse.

Es wurde festgestellt, dass Silikonöle als Endotamponade ohne höhere Risiken auch bei idiopathischen Makulaforamina verwendet werden können und dabei eine Verbesserung des Visus und Reduktion von Metamorphopsien bei den Patienten zeigte (Ivanovska-Adjevska, Boskurt et al. 2012). Bei der Behandlung von traumatisch induzierten Makulaforamina hingegen zeigte sich, im Vergleich von Silikonöl und Gas als Endotamponade, das Gas als die vorteilhaftere Wahl anzusehen ist. C3F8 Gas zeigte einen signifikant besseren Verschluss der traumatisch induzierten Makulaforamina mit weniger Re-Operationen, sowie einen besseren Visus der mit Gas behandelten Patienten (Ghoraba, Ellakwa et al. 2012).

Auch bei komplizierten Fällen zeigte die Verwendung von Silikonölen in den folgenden klinischen Studien gute Ergebnisse. Zur Behandlung von Netzhaut Riesenrissen größer als 180° zeigt sich die Silikonölinjektion nach PPV in Kombination mit Plombage und 360° Laserretinopexy als eine effektive Therapie, ohne dass Silikonöl unter die Netzhaut gelangt (retinal slippage) (Kirchhof 2007) (Dabour 2014). In der Langzeit follow-up Studie von Shen und Yang über 12 Monate nach PPV und Silikonölinjektion konnten auch für Patienten mit proliferativer diabetischer Retinopathie gute anatomische Ergebnisse und funktionelle Stabilität des Visus der Patienten, bei Verwendung von Silikonölendotamponaden, erzielt werden (Shen und Yang 2007). Für die Behandlung von Netzhautablösungen, die mit

proliferativer Vitreoretinopathie assoziiert sind, bestätigt sich Silikonöl als Endotamponade ebenfalls als eine gute Wahl (Schwartz, Flynn et al. 2014).

Der Einfluss von Silikonöltamponaden auf den vorderen Augenabschnitt wurde ebenfalls bereits untersucht. Veränderungen im Zusammenhang mit Silikonöl in der Vorderkammer des Auges, wie eine Zunahme der Vorderkammertiefe in der ersten postoperativen Woche und die Zunahme der zentralen Korneadicke im ersten postoperativen Monat, sind reversible Effekte (Calik, Ozturk et al. 2013). Ein Einfluss von Silikonöl auf die Biomechanik der Hornhaut ist in den frühen post-operativen Stadien möglich aber sehr wahrscheinlich im Zusammenhang mit anderen Faktoren (Teke, Elgin et al. 2014).

Eine in vivo Untersuchung der Netzhaut am Schwein, als Tiermodell, im Zusammenhang mit Silikonöl ist bisher noch nicht durchgeführt worden.

Im Tierversuch am Kaninchen die eine Silikonölinjektion nach PPV erhielten, konnte allerdings mittels ELISA und immunhistochemischer Färbung des Hypoxie induzierenden Faktor-1-Alpha (HIF-1 α) und dem Wachstumsfaktor VEGF (vascular endothelial growth factor) nach 180 Tagen keine pathologische vaskuläre oder hypoxische Veränderung auf der Netzhaut festgestellt werden (Yang, Yuan et al. 2014).

Anzeichen retinaler Toxizität der Silikonöltamponade traten auch in frühen klinischen Studien nicht auf (Lucke, Foerster et al. 1987). In der 2014 von Caramoy, A., et al. (Caramoy, Droege et al. 2014) veröffentlichten Untersuchung der Netzhautschichten an gesunden Augen und Augen, die mit einer Silikonölotamponade versorgt wurden, wurde mittels SD-OCT (Spektral domain optical coherence imaging) und ImageJ Software in einer klinischen Studie die Veränderung der Netzhautdicke bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Verwendung von Silikonöl zu einem Verdünnen der inneren Netzhautschichten geführt hatte. Hierbei waren vor allem die Ganglienzellschicht und die innere plexiforme Schicht betroffen.

Silikonöltamponaden haben sich auch bei der PPV Indikation bei post-operativer Endophthalmitis bewährt (Pinarci, Yesilirmak et al. 2013). Die Behandlung der akuten Endophthalmitis mit intravitrealen Antibiotika und zusätzlicher PPV mit Silikonölinjektion erzielt bessere Therapieergebnisse als die alleinige

Antibiotikatherapie oder PPV ohne Silikonöl (Siqueira, Gil et al. 2009, Do, Hon do et al. 2014). Bei einigen Silikonölen lässt sich sogar ein antimikrobieller Effekt vermuten (Chrapek, Vecerova et al. 2012).

10.2 Silikonölentfernung

Die Silikonöle werden in der Regel nur für einige Monate bis maximal 2 Jahre im Auge des Patienten belassen und werden dann in einem zweiten operativen Eingriff wieder entfernt. Die Entfernung des Öls wird durchgeführt, um Nebenwirkungen des Silikonöls wie Emulsifikationsvorgänge und Toxizität an der Retina zu vermeiden (Khoroshilova-Maslova, Nabieva et al. 2012, Zafar, Bokhari et al. 2013). Die Entfernung des Öls zeigte zwar keine verbesserten anatomischen Ergebnisse, erhöhte jedoch in der 1998 durchgeführten Studie von Han, L., et al. das postoperative Sehvermögen der Patienten (Han, Cairns et al. 1998).

Mit der Entfernung des Silikonöls und dementsprechend einem weiteren operativen Eingriff am Patienten sind verschiedene Komplikationen verbunden, wobei die wiederholte Ablösung der Netzhaut die häufigste ist (Zafar, Bokhari et al. 2013).

Eine retrospektive Studie über komplexe Netzhautablösungen von Al-Wadani. S.F. et al., 2014 (Al-Wadani, Abouammoh et al. 2014), beinhaltete Patienten mit proliferativer Vitreoretinopathie, schwieriger rhegmatogener Netzhautablösung und diabetischer traktiver Netzhautablösung für die eine PPV mit Silikonöltamponade und späterer Entfernung indiziert war. Insgesamt zeigte sich ein gutes anatomisches Ergebnis nach der Silikonölentfernung. Desweiteren war in der Gruppe der rhegmatogenen Netzhautablösungen ein höheres Alter (> 16 Jahre), normaler IOP und das Fehlen einer relaxierenden Retinotomie im primären Eingriff mit einer Netzhautanheftung assoziiert. Es zeigten sich auch in dieser Untersuchung Komplikationen bei der Silikonölentfernung wie das Auftreten von Katarakten bei phaken Augen (100%), Keratopathie 83.8%) und Hypotonie (2.1%). Eine kurz darauf veröffentlichte Studie zeigte, dass die Ätiologie der Netzhautablösung, inadäquates Schälen der Glaskörperbasis, fehlende intraoperative Plombage und Glaskörperhämorrhagien in der ersten postoperativen Woche signifikante Risikofaktoren sind, die mit der Wiederablösung der Netzhaut nach Silikonölentfernung assoziiert sind. Der prä-operative Visus, die Viskosität des Silikonöls sowie die Dauer des Silikonöls im Auge hatten hingegen keinen

signifikanten Effekt auf die wiederholte Netzhautablösung (Teke, Balikoglu-Yilmaz et al. 2014).

Eine vorrausgegangene Studie zur Prognose der Wiederablösung der Netzhaut nach Silikonölenfernung bestätigte dass viele Komplikationen durch aggressive Entfernung der Glaskörperbasis gesenkt werden konnten. Die Durchführung einer Retinotomie, Laser Retinopexie und das komplette Auffüllen des Bulbus mit Silikonöl waren weitere Maßnahmen die Komplikationen senken konnten (Choudhary, Choudhary et al. 2012).

10.3 Das in vitro Perfusionssystem

Für die Versuchsdurchführung dieser Arbeit wurde ein etabliertes Perfusionssystem (Minucells und Minutissue, Bad Abbach, Deutschland) verwendet welches bisher schon für die Organkultur embryonischer retinaler Epithelzellen (Minuth, Stockl et al. 1992, Schumacher, Strehl et al. 2002), RPE (Framme, Kobuch et al. 2002) und für die Gewebezüchtung (Minuth, Schumacher et al. 2000) eingesetzt wurde. Zudem wurde bereits in vorausgegangenen Versuchen die Aufrechterhaltung der adulten porkinen Retina und RPE in der in vitro Perfusion untersucht (Kobuch, Herrmann et al. 2008). Durch die durchlaufende Versorgung mit dem pumpengetriebenen Perfusionssystem konnte das Gewebe kontinuierlich mit frischen Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden und gleichzeitig Kohlenstoffdioxid und andere Abfallprodukte wieder abtransportiert werden. Dies ermöglichte eine gute Imitation der Netzhautversorgung in vivo durch die retinale und choroidale Blutversorgung.

10.4 Proliferation

Mikroskopisch zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse durch den Einfluss von Siluron Xtra[®] innerhalb der 3 verschiedenen Versuchsgruppen.

Es stellte sich heraus, dass das Silikonöl in der VG 1 möglicherweise eine Schutzfunktion auf die NH und das darunterliegende RPE hatte, weshalb unterm Lichtmikroskop in der VG 1 weniger Proliferationen in den mit Ki67 markierten Schnitten als in VG 2, der Kontrollgruppe ohne Silikonöl, sichtbar waren.

Es lässt sich somit ein direkter antiproliferativer Einfluss des Silikonöls auf die Proliferationsrate der Zellen im RPE bei intakter NH feststellen.

Vergleichbare Proliferationsraten wie in der Kontrollgruppe zeigten sich bei dem

direkten Kontakt des Silikonöls mit RPE in VG 3. Diese VG diente der Darstellung der Situation im Auge eines Patienten mit Zustand nach Netzhautriss oder Formina mit anschließender operativer Glaskörperentfernung und intraokularer Silikonöltamponade, bei der es zu einem Durchtritt des Silikonöls durch die NH und somit direktem Kontakt des Öls zum RPE kommen könnte. Beispielsweise im Fall von insuffizientem Verschluss der beschädigten NH während der Operation oder postoperativen Perforationen in der Netzhaut.

Es ließ sich somit zeigen, dass der direkte Kontakt zwischen Silikonöl und RPE zu keinem Anstieg der Proliferationen der RPE Zellen führt.

Eine Untersuchung der alleinigen Schutzfunktion der NH auf Proliferationen im RPE in einer RPE Kontrollgruppe ohne Silikonöl wurde nicht durchgeführt, da sie für die Fragestellung der Bioverträglichkeit des Öls auf die NH von untergeordneter Bedeutung ist.

10.5 GFAP Expression

In der Auswertung der Ergebnisse zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der GFAP Markierung zwischen der Netzhaut Versuchsgruppe (VG 1) und der Kontrollgruppe (VG 2). So lässt sich eine Beeinträchtigung des Silikonöls Siluron Xtra® auf die GFAP Expression ausschließen.

Die GFAP Expression in den Müller'schen Stützzellen selbst kann auf ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren zurückzuführen sein.

Obwohl unter dem Lichtmikroskop keine histologischen Zersetzungsvorgänge an den verwendeten Präparaten sichtbar waren, lässt sich nicht komplett ausschließen, dass von den verwendeten makroskopisch intakten Präparaten ultramikroskopisch einige bereits zum Zeitpunkt des Perfusionsansatzes weiter degeneriert waren als andere.

Eine vorausgegangene Studie untersuchte die Effekte von post mortem Zeit und Lagerungsdauer des normalen, humanen, erwachsenen Auges in 2% PFA Einbettung, auf die Expression von GFAP (Wu, Penfold et al. 2002). Hierbei wurde kein signifikanter Effekt der GFAP Immunreaktivität in Bezug auf die Lagerungsdauer in PFA Fixans festgestellt. Zur Fixierung des Gewebes in diesem Versuch wurde ebenfalls PFA verwendet (4% PFA). Es zeigte sich jedoch eine signifikante Zunahme der GFAP Markierung bei prolongierter post mortem Zeit von mehr als 30 Stunden.

Die post mortem Zeiten der verwendeten Präparate variierten lediglich zwischen 1.5 Stunden und maximal 4.3 Stunden weshalb von keiner gravierender Ausprägung der unterschiedlichen post mortem Zeiten auf die GFAP Expression in diesem Versuch ausgegangen wird.

In einer anderen aktuellen Untersuchung zeigten sich im Mausmodell bei Beschädigungen des retinalen Gewebes reaktive Proliferationen der Müller'schen Stützzellen. Die Ausprägung dieser beschädigungsinduzierten Proliferationen variierten jedoch zwischen verschiedenen Mäusestämmen [25]. Ob die Untersuchung am Mäusemodell direkt auf das Schweinmodell übertragen werden kann ist allerdings unklar. Die unterschiedlichen post mortem Degenerationszeiten der einzelnen Präparate, bei konstanter Todeszeit und Lagerung, könnten in dem Fall mitunter auf unterschiedliche Rassen und genetische Profile der Schweine zurückzuführen sein. Die Rasse und genetische Profile der verwendeten Schweine in dieser Untersuchung waren unbekannt.

10.6 Luftblasen in der Perfusion

Während der Perfusion traten unerwünschter Weise Luftblasen auf, die sich jedoch in der Auswertung der Ergebnisse als sinnvoll erwiesen. Auf das menschliche Auge übertragen, stellen sie im Modell eine intraokulare Lufttamponade dar. Luft, auch klinisch postoperativ nach unkomplizierten Glaskörperentfernungen als Glaskörperersatzmittel verwendet, zeigte in einer Studie, bei gleicher Effektivität, geringe Komplikation gegenüber dem Goldstandard der Gastamponade (Gesser, Eckert et al. 2010, Zhou, Qiu et al. 2015). Die histologischen Ergebnisse, die keine luftabhängigen Beschädigungen der NH zeigten, bestätigten vergangene klinische Studien, die hohe Erfolgsraten bei Netzhautablösung mit PPV Indikation und anschließender Lufttamponade erreichten (Mateo-Montoya und de Smet 2014). Eine andere Studie, die Netzhautverschlüsse bei Makulaforamina untersuchte, zeigte mit Hilfe eines speziell angelegten OCT ebenfalls eine hohe Verschlussrate bei intravitrealer Tamponade des Auges mit Luft (Eckardt, Eckert et al. 2008).

Auf Grund der kurzen Perfusionsdauer dieser Untersuchung von maximal 7 Tagen lösten sich bis zum Ende des Perfusionszeitraumes nicht alle Luftblasen auf. In einer vorausgegangenen postoperativen Studie am Patienten wurde jedoch festgestellt,

dass sich Luftblasen innerhalb von 7-10 Tagen im menschlichen Auge lösten (Mateo-Montoya und de Smet 2014).

Sowohl die Verwendung von Silikonöl, sowie die von Luft als Tamponade zeigten in vorausgegangenen Studien gute Ergebnisse bei Patienten mit Netzhautablösungen. In Betracht dieser ex vivo Experimente am porcinen Auge, scheint das tierische Gewebe zumindest für einen Zeitraum von mindesten 48 Stunden, trotz Unterbrechungen frischer Medium Zufuhr, keine strukturellen Schäden davon getragen zu haben.

10.7 Auswertung und Versuchsdesign

Die histologische und immunhistochemische Beurteilung der Gewebe unter dem Lichtmikroskop ist eine gute Konservierungsmethode für die komplexe Struktur der Netzhaut im Vergleich zu anderen Explantatmodellen (Kobuch, Herrmann et al. 2008). Dennoch sind die Beurteilung mit lichtmikroskopischer Vergrößerung sowie immunhistochemische Färbung limitiert. Ultrastrukturen die sonst mit einem Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden könnten, waren nicht zu beurteilen.

Eine große Schwierigkeit im Versuchsdesign war der Einfluss einer Vielzahl schwer kontrollierbarer Faktoren.

Konstanten konnten vor allem während der Perfusion erhalten werden. Die Perfusionsdauer und Temperatur des Mediums konnte mit Eisbeuteln und einer konstant auf 41°C gestellten Wärmeplatte gut kontrolliert werden. Auch die Durchflussgeschwindigkeit des Mediums durch die Perfusionskammer konnte mit der elektrischen Pumpe bei einer konstanten Geschwindigkeit von 3 ml/Std gut kontrolliert werden. Tägliche Kontrollen der Flüssigkeitsstände in den Flaschen bestätigten dies. Alle verwendeten Materialien für die Präparation und das Perfusionskonstrukt blieben konstant und konnten durch sorgfältige Reinigung und Sterilisation unbeeinträchtigt wiederverwendet werden.

Die Zubereitung und das Auffüllen von frischem Medium erfolgten unter einer Sterilisationsbank, um Einflüsse von außen zu limitieren. Zum Schutz vor bakterieller Infizierung des Mediums wurde 1% Penicillin Streptomycin in das Gemisch gegeben. Es konnte während der Perfusion keine Kontaminationen festgestellt werden.

Es wurde auf eine konstante Zusammensetzung aller Flüssigkeiten, das Medium, das Fixans, histologische Färbematerialien und Silikonöl, welches von der Firma Fluoron gestellt wurde, geachtet.

Weniger beeinflussbar waren vor allem menschliche Fehlerquellen und unbekannte Faktoren.

Die frischen Augen wurden früh morgens vom Münchener Schlachthof abgeholt und innerhalb von 30 Minuten in das Labor der Augenheilkunde des Klinikums Rechts der Isar transportiert. In dieser Zeit waren die Augen trotz des Transportes im Kühlbeutel unterschiedlichen Wetterbedingungen ausgesetzt.

Die Augen wurden zwar jedes Mal vom gleichen Metzger (Münchner Schlachthof Betriebs GmbH, München, Deutschland) bestellt, jedoch war die Herkunft der Schweine unklar da der Münchener Schlachthof Zulieferungen aus ganz Europa erhält. Auch war das Alter und der gesundheitliche Zustand der Schweine unbekannt, wobei davon ausgegangen werden kann, dass sie gesundheitlich den Richtlinien der EU Lebensmittelindustrie entsprechen.

Auch die Transportzeit vom Schlachthof ins Labor, sowie die Präparationszeit der Netzhäute, in denen die Augen ohne Medium bzw. Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr, die ersten Zersetzungsvorgänge ausgesetzt waren, müssen in Betracht gezogen werden. Trotz der Entnahme aller Exemplare zum gleichen Zeitpunkt zeigten sich während der Präparation der Schweineaugen schon schwere Zersetzungsvorgänge bei einigen Präparaten. Diese zeigten sich schon während der Präparation durch andeutes, sich auflösendes RPE mit Ablösung der aufliegenden Netzhaut in einigen Bulbi, weshalb diese Präparate nicht für die Versuche verwendet wurden.

Alle Präparationen wurden vom selben Operateur durchgeführt. Auf Grund der neu erlernten Präparationstechnik zeigte sich aber natürlicherweise im Verlauf der Zeit ein feinfühligeres Geschick mit ansteigender Lernkurve und dadurch entsprechend schnellere und präzisere Arbeit die sich zum Teil auch in den Ergebnissen gezeigt hat.

Die Präparation unter dem Operationsmikroskop erfordert sehr viel Konzentration die bei einer durchgehenden Arbeit von bis zu 4 Stunden nicht immer konstant aufrecht zu erhalten ist. Minimale Unvorsichtigkeiten zeigen sich in der lichtmikroskopischen

Vergrößerung z.B. als Einschnitte der scharfen Operationsinstrumente in die äußeren Schichten der Netzhaut.

Nicht alle Präparate konnten unversehrt präpariert werden. Netzhautrisse entstanden vor allem beim Überstülpen des Gewebes auf die Minucell Ringe.

Während der Perfusion kam es gelegentlich zur Bildung von Luftbläschen, die trotz bestmöglicher Abdichtung des Schlauchsystems nicht zu verhindern waren.

Größere Schwierigkeiten ergaben sich auch beim Zuschneiden der Paraffinschnitte. Trotz gleicher Fixierung der Präparate löste sich die, ohnehin nur locker aufliegende, Netzhaut in einigen Präparaten vom RPE, zerfiel im heißen Paraffin und konnte dann nicht mehr auseinander gefaltet werden. Das strukturell stabilere RPE konnte jedoch immer erhalten werden und auch weiterhin für die immunhistochemische Färbung mit dem Ki67 Marker verwendet werden.

10.8 Schlussfolgerung

Als Schlussfolgerung lässt sich sagen, dass das neue Silikonöl Siluron Xtra® der Firma Fluoron in der histologischen Auswertung eine gute Bioverträglichkeit auf porkiner Netzhaut und auf retinalem Pigmentepithel zeigt. Als unerwartetes Ergebnis zeigte die Verwendung von Siluron Xtra® zusätzlich eine mögliche Proliferationsschutzfunktion auf die Netzhaut.

In Anbetracht des zukünftigen klinischen Einsatzes hat die Verwendung von Siluron Xtra® als Glaskörperersatzstoff durch seine Schutzfunktion an der Netzhaut möglicherweise einen Vorteil gegenüber den alternativen Ersatzstoffen Wasser und Gas.

Auch im Fall von postoperativen Netzhautrissen und insuffizient verschlossenen Netzhautperforationen führt Siluron Xtra® zu keinen biologischen Unverträglichkeiten bei direktem Kontakt mit dem RPE.

Eine histologische Untersuchung der Bioverträglichkeit von Gas und Wasser auf die Netzhaut sind für die zukünftige Forschung von Interesse, um einen eindeutigen Vorteil der protektiven Wirkung des Silikonöls gegenüber den anderen Glaskörperersatzstoffen zu bestätigen.

11 Zusammenfassung

Einleitung: In dieser Arbeit wurde eine in vitro Untersuchung der organspezifischen Bioverträglichkeit des Silikonöls Siluron Xtra® (Fluoron, Ulm, Germany) auf der porkinen Netzhaut untersucht, ein Silikonöl das regelmäßig in der vitreo-retinalen Chirurgie eingesetzt wird.

Methoden: Insgesamt wurden 37 retinale porkine Gewebeproben post mortem entnommen und präpariert. In einem Minucell Perfusionssystem (Minucell, Bad Abbach, Germany) wurden die Präparate über einen Zeitraum von 4-8 Tagen mit flüssigem Nährmedium perfundiert. 23 retinale Gewebeproben, mit anliegendem retinalen Pigmentepithel (RPE), wurden mit Silikonöl bedeckt und perfundiert (Versuchsgruppe 1).

Diese wurden mit einer Kontrollgruppe aus 7 Gewebeproben (Versuchsgruppe 2) verglichen, die ohne Silikonöl, perfundiert wurde. Die Versuchsgruppe 3 enthielt 7 RPE Gewebeproben, ohne aufliegende Retina, die in direktem Kontakt mit dem Silikonöl perfundiert wurden. Hierbei wurde versucht, die Situation bei einem Netzhautloch zu imitieren.

Nach histologischer Bearbeitung und Färbung mit Haematoxylin und Eosin (HE) wurden die Netzhautproben morphologisch unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Die Präparate wurden mit saurem Gliafaserprotein (GFAP) immunhistochemisch angefärbt um eine Beschädigung der Müller'schen Stützzellen nachzuweisen. Der immunhistochemische Marker Ki67 wurde verwendet, um Proliferationsvorgänge im RPE nachzuweisen.

Ergebnisse: Die Färbung mit Ki67 zeigte in den mit Silikonöl bedeckt perfundierten Gewebeproben (Versuchsgruppe 1) signifikant geringere Proliferation im Vergleich zu den Kontrollen in Versuchsgruppe 2, ohne Silikonöl ($p=0,001$).

Das RPE im direkten Kontakt mit Silikonöl (Versuchsgruppe 3) zeige keine signifikanten Proliferationen im Vergleich zu den Kontrollen ($p=1$).

Die GFAP Färbung erzielte keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Müllerzellbeschädigung und dem Kontakt zu Siluron Xtra® ($p=0,9$).

In der HE Färbung wurden keine strukturellen Beschädigungen des Netzhautgewebe im Zusammenhang mit dem Silikonöl festgestellt.

Schlussfolgerung: Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Siluron Xtra® in vitro eine gute Bioverträglichkeit auf die porkine Netzhaut hat. Darüber hinaus konnte

ein möglicher Proliferationsschutz des Silikonöls auf die Retina nachgewiesen werden.

Zukünftig sind weitere Untersuchungen alternativer Silikonöle und anderer Glaskörperersatzstoffe wie Gas und Wasser notwendig um einen protektiven Vorteil des Silikonöls Siluron Xtra[®] auf die Proliferation im Netzhautgewebe zu bestätigen.

12 Verzeichnis der Abbildungen

12.1 Abbildungen Präparation und Perfusion

12.1.1 Frische, gereinigte porkine Bulbi in steriler Küvette

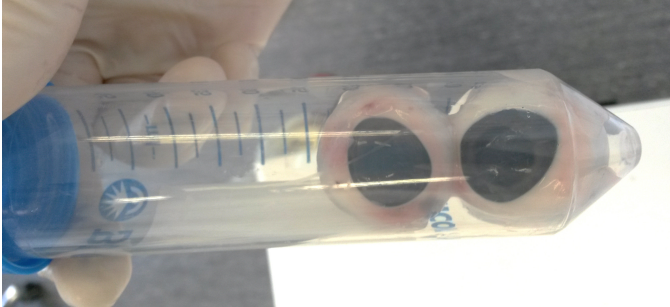


Abbildung 13

12.1.2 Präparationstisch mit Operationsbesteck



Abbildung 14

12.1.3 Präpariertes Netzhautgewebe vor der Perfusion in Medium gelegt

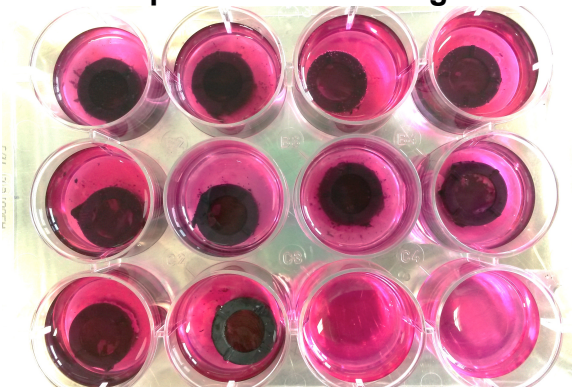


Abbildung 15

12.1.4 Platzierung der Präparate in die Kammern und Zugabe von Siluron Xtra® unter der Sterilisationsbank



Abbildung 16

12.1.5 Vollständiges Perfusionskonstrukt



Abbildung 17

12.1.6 Eröffnete Perfusionskammer mit Präparaten nach der Perfusion

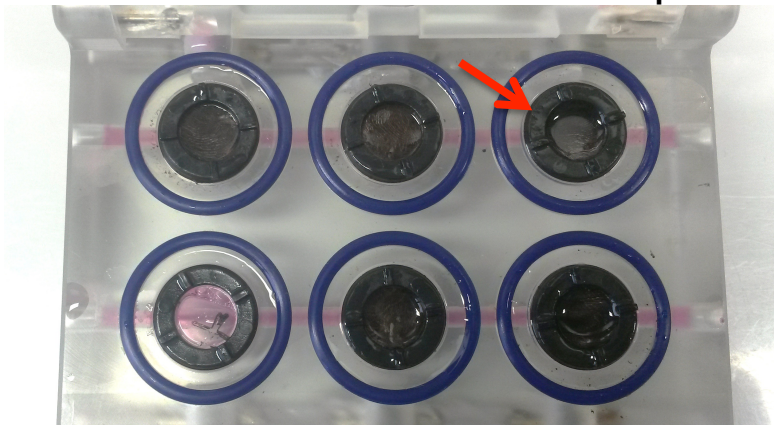


Abbildung 18 (Pfeil: Silikon noch sichtbar auf dem Präparat aufliegend nach der Perfusion)

12.1.7 Präparate in 4% PFA Fixans eingebettet

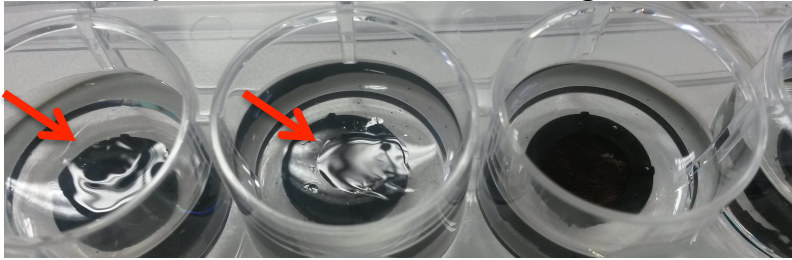


Abbildung 19

Pfeil: Abgelöstes Silikon schwimmt sichtbar auf der Oberfläche des Fixiermittel

12.1.8 Material für die Weiterverarbeitung der fixierten Präparate

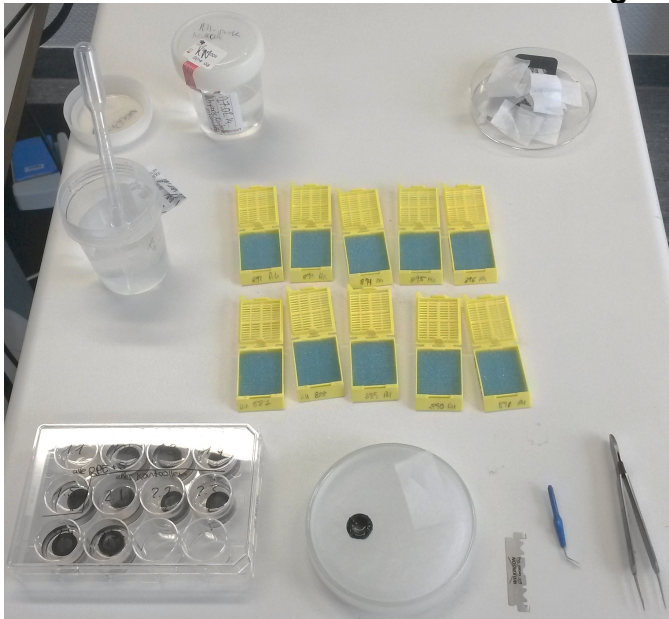


Abbildung 20

12.2 Abbildungen histologischer Präparate

12.3 HE Färbung:

12.3.1 Zusammen gezogene Körnerschicht bei strukturell intakter NH und RPE

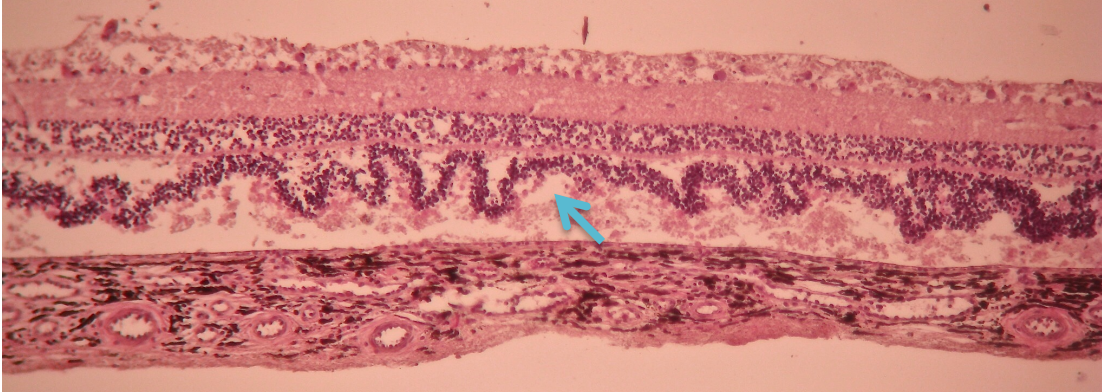


Abbildung 21 , entnommen aus VG 1 bei 20-facher Vergrößerung

12.3.2 NH und RPE aus der Kontrollgruppe

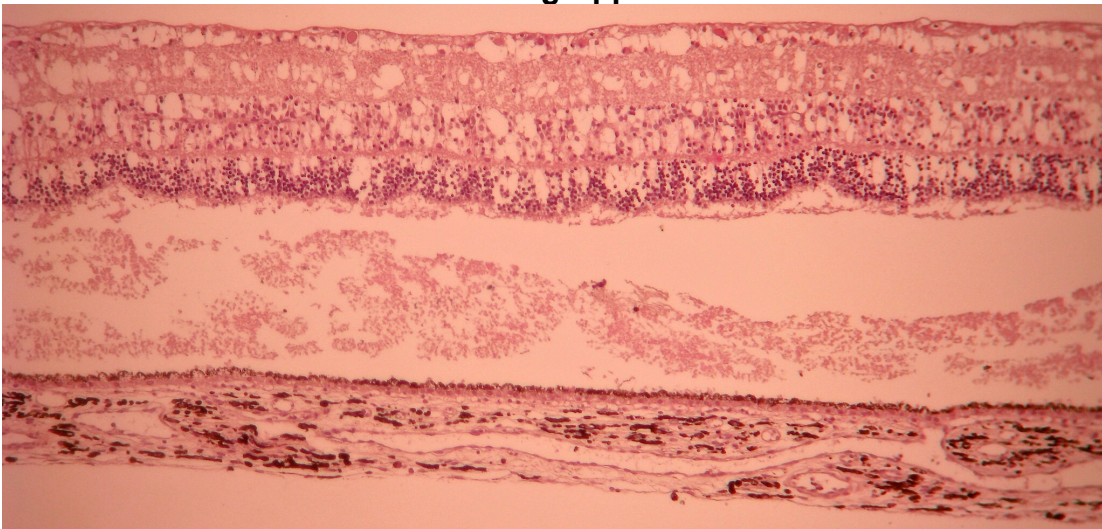


Abbildung 22, entnommen aus VG 2 bei 20-facher Vergrößerung

12.3.3 RPE mit direktem Kontakt zu Siluron Xtra®

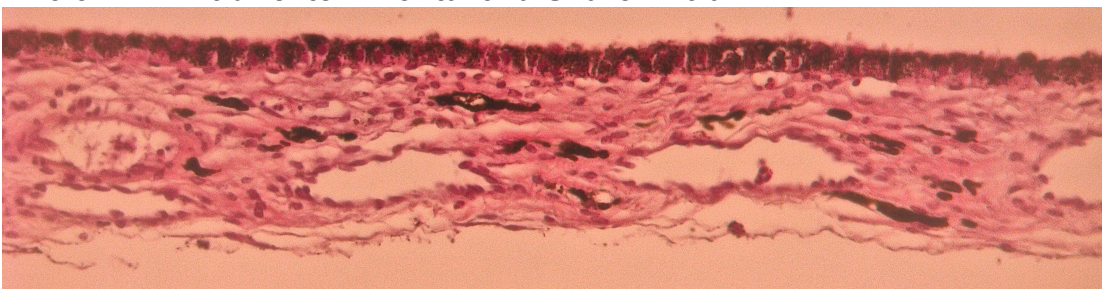


Abbildung 23, entnommen aus VG 3 bei 20-facher Vergrößerung

12.4 GFAP Färbung:

12.4.1 Positive Färbung der Müller'schen Stützzellen mit GFAP (VG 1)

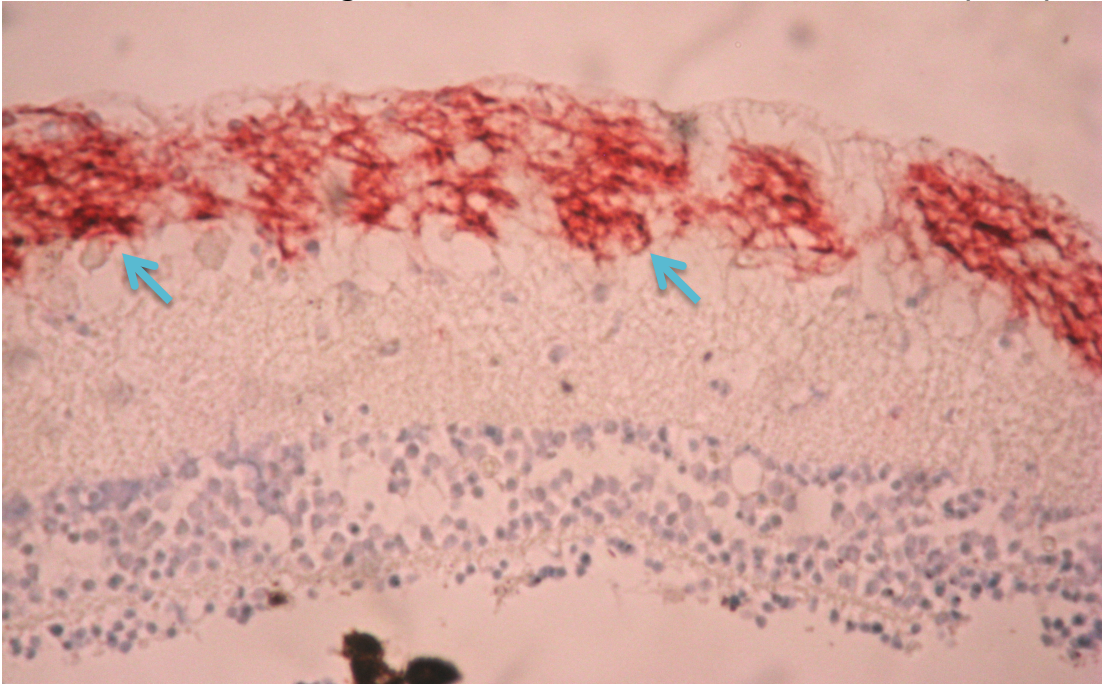


Abbildung 24, entnommen aus Versuchsgruppe 1 in 40-facher Vergrößerung

12.4.2 Positive Färbung der Müller'schen Stützzellen mit GFAP (Kontrollgruppe)

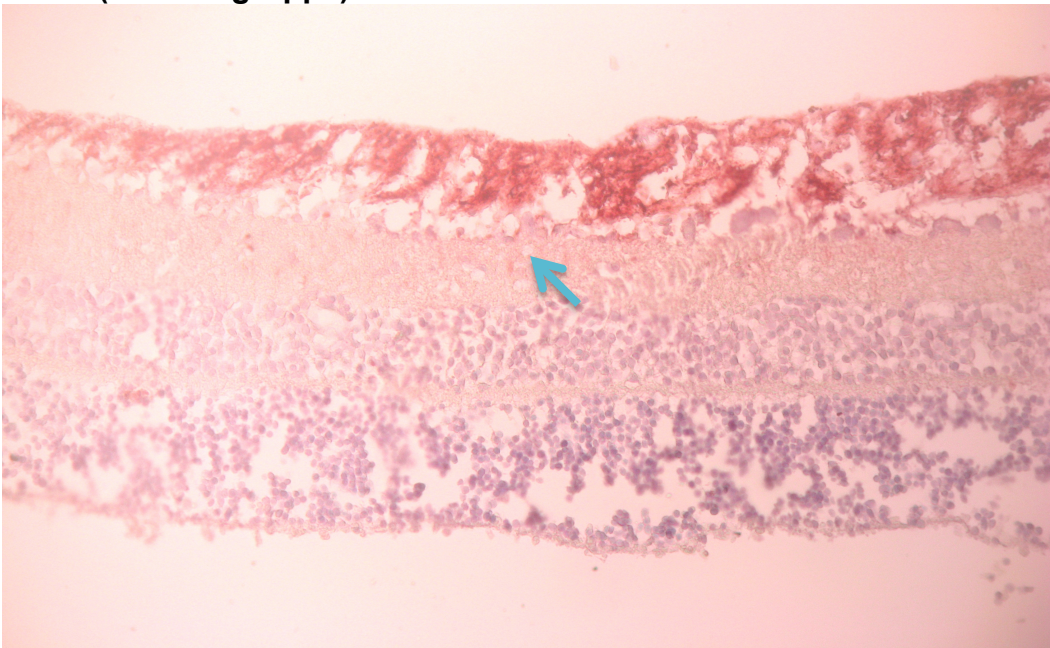


Abbildung 25, entnommen aus Versuchsgruppe 2 in 40-facher Vergrößerung

12.5 Ki67 Färbung:

12.5.1 RPE ohne Proliferationen bei Perfusion mit Siluron Xtra®

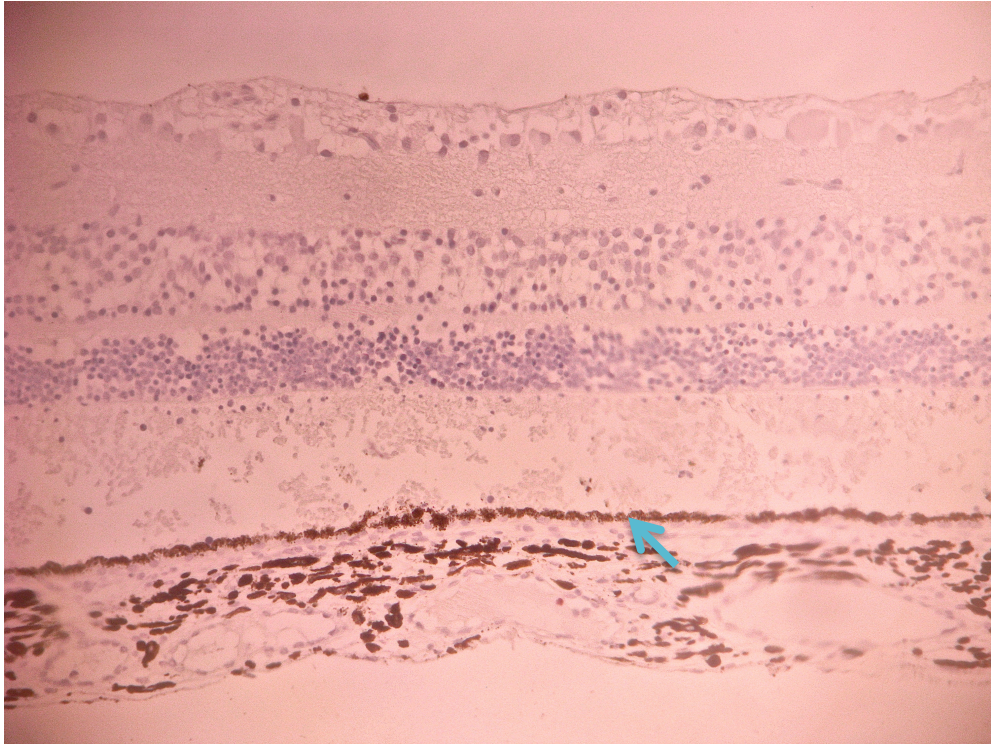


Abbildung 26, entnommen aus Versuchsgruppe 1 in 20-facher Vergrößerung

12.5.2 RPE ohne Proliferationen in der Kontrollgruppe

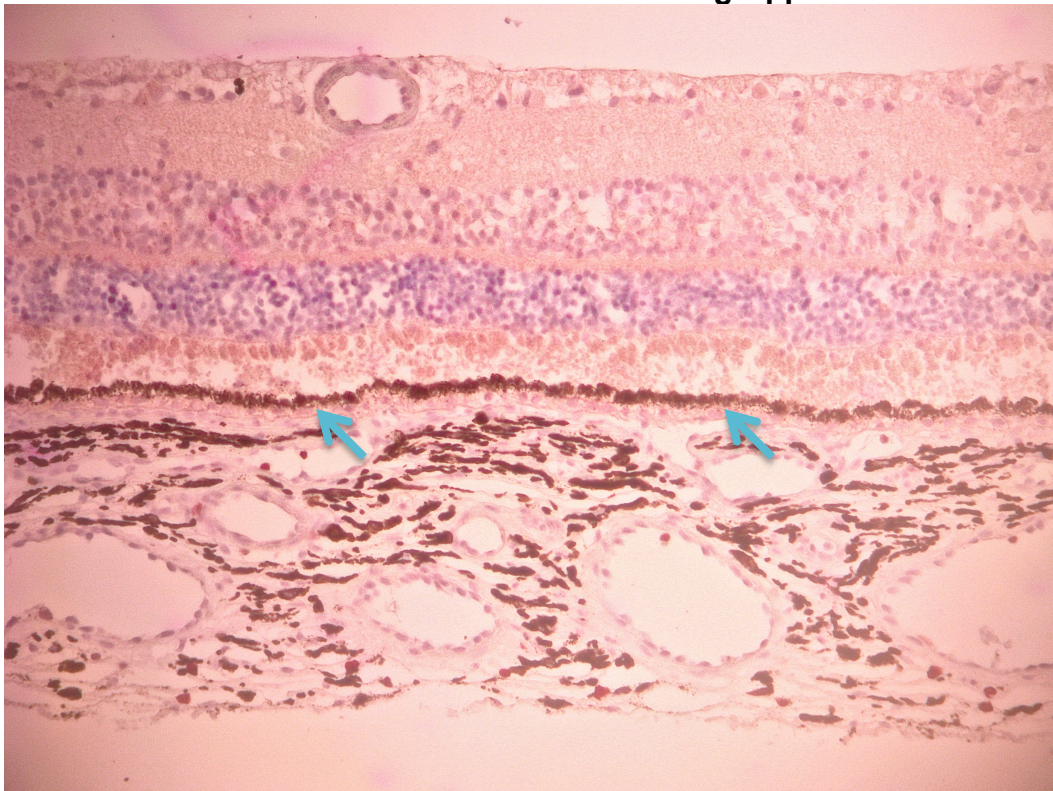


Abbildung 27, entnommen aus Versuchsgruppe 2 in 20-facher Vergrößerung

12.5.3 Ki67 Proliferationsherde (rot) im RPE nach Perfusion mit Siluron Xtra®

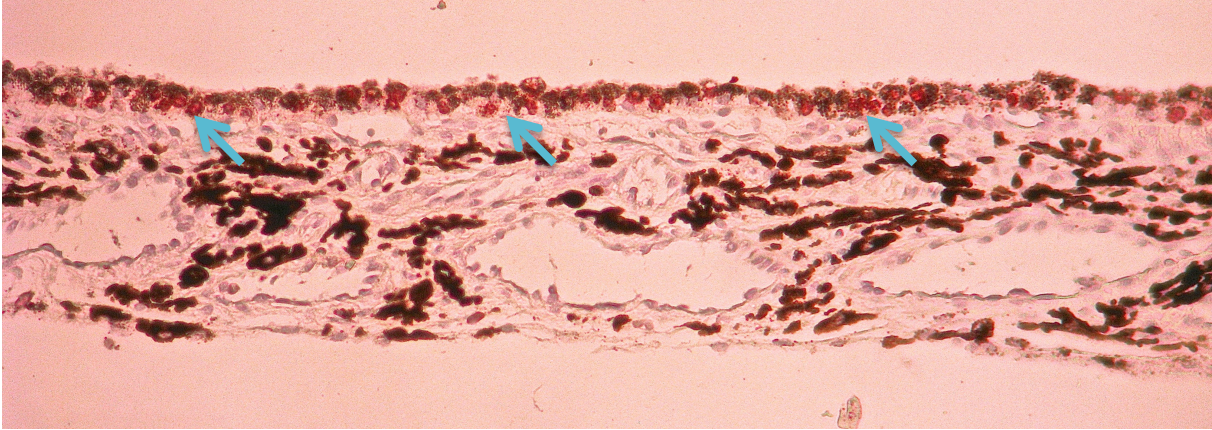


Abbildung 28, entnommen aus Versuchsgruppe 3 in 40-facher Vergrößerung

13 Literaturverzeichnis

Al-Wadani, S. F., M. A. Abouammoh und A. M. Abu El-Asrar (2014). "Visual und anatomical outcomes after silicone oil removal in patients with complex retinal detachment." Int Ophthalmol **34**(3): 549-556.

Bambas, B., C. Eckardt, E. Vowinkel und H. Kruse (1995). "[Toxic substances with silicone oil after intraocular injections]." Ophthalmologe **92**(5): 663-667.

Banaee, T. (2012). "Early decomposition of retained heavy silicone oil droplets." J Ophthalmic Vis Res **7**(1): 64-66.

Bartov, E., F. Pennarola, N. Savion, N. Naveh und G. Treister (1992). "A quantitative in vitro model for silicone oil emulsification. Role of blood constituents." Retina **12**(3 Suppl): S23-27.

Beauchemin, M. L. (1974). "The fine structure of the pig's retina." Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol **190**(1): 27-45.

Bullwinkel, J., B. Baron-Luhr, A. Ludemann, C. Wohlenberg, J. Gerdes und T. Scholzen (2006). "Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent und proliferating cells." J Cell Physiol **206**(3): 624-635.

Calik, B., M. Ozturk, H. Serdarogullari und M. Elcioglu (2013). "Evaluation of anterior segment parameters using pentacam in silicone oil-injected patients after pars plana vitrectomy." Indian J Ophthalmol **61**(11): 621-625.

Caramoy, A., K. M. Droege, B. Kirchhof und S. Fauser (2014). "Retinal layers measurements in healthy eyes und in eyes receiving silicone oil-based endotamponade." Acta Ophthalmol **92**(4): e292-297.

Caramoy, A., N. Hagedorn, S. Fauser, W. Kugler, T. Gross und B. Kirchhof (2011). "Development of emulsification-resistant silicone oils: can we go beyond 2000 mPas silicone oil?" Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(8): 5432-5436.

Caramoy, A., S. Schroder, S. Fauser und B. Kirchhof (2010). "In vitro emulsification assessment of new silicone oils." Br J Ophthalmol **94**(4): 509-512.

Chan, Y. K., C. O. Ng, P. C. Knox, M. J. Garvey, R. L. Williams und D. Wong (2011). "Emulsification of silicone oil und eye movements." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(13): 9721-9727.

Chan, Y. K., D. Wong, H. K. Yeung, P. K. Man und H. C. Shum (2015). "A low-molecular-weight oil cleaner for removal of leftover silicone oil intraocular tamponade." Invest Ophthalmol Vis Sci **56**(2): 1014-1022.

Chen, K. und J. D. Weiland (2013). "Relationship between vitreous temperature und posterior vitreous detachment." J Mech Behav Biomed Mater **26**: 54-58.

Choudhary, M. M., M. M. Choudhary, M. U. Saeed und A. Ali (2012). "Removal of silicone oil: prognostic factors und incidence of retinal redetachment." Retina **32**(10): 2034-2038.

Chrapek, O., R. Vecerova, D. Koukalova, K. Maresova, B. Jirkova, M. Sin und J. Rehak (2012). "The in vitro antimicrobial activity of silicone oils used in ophthalmic surgery." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub **156**(1): 7-13.

Dabour, S. A. (2014). "The outcome of surgical management for giant retinal tear more than 180 degrees." BMC Ophthalmol **14**: 86.

Do, T., N. Hon do, T. Aung, N. D. Hien und C. L. Cowan, Jr. (2014). "Bacterial endogenous endophthalmitis in Vietnam: a randomized controlled trial comparing vitrectomy with silicone oil versus vitrectomy alone." Clin Ophthalmol **8**: 1633-1640.

Eckardt, C., T. Eckert, U. Eckardt, U. Porkert und C. Gesser (2008). "Macular hole surgery with air tamponade und optical coherence tomography-based duration of face-down positioning." Retina **28**(8): 1087-1096.

Eng, L. F., R. S. Ghirnikar und Y. L. Lee (2000). "Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000)." Neurochem Res **25**(9-10): 1439-1451.

Feibel, R. M. und C. F. Blodi (2013). "Paul A. Cibis, MD: a pioneer of modern vitreoretinal surgery." JAMA Ophthalmol **131**(8): 1077-1082.

Fernandez-Bueno, I., E. Rodriguez de la Rua, D. Hileeto, M. L. Parrado, M. Regueiro-Purrinos, A. Sala-Puigdollers, G. K. Srivastava, J. M. Gonzalo-Orden und J. C. Pastor (2013). "Histology und immunochemistry evaluation of autologous translocation of retinal pigment epithelium-choroid graft in porcine eyes." Acta Ophthalmol **91**(2): e125-132.

Fluoron (2015). Siluron Hochreine Silionöle zur intraokularen Anwendung. G. AG, Fluoron GmbH.

Framme, C., K. Kobuch, E. Eckert, J. Monzer und J. Roeder (2002). "RPE in perfusion tissue culture und its response to laser application. Preliminary report." Ophthalmologica **216**(5): 320-328.

Gabel, V. P., A. Kampik und J. Burkhardt (1987). "Analysis of intraocularly applied silicone oils of various origins." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **225**(3): 160-162.

Gesser, C., T. Eckert, U. Eckardt, U. Porkert und C. Eckardt (2010). "[Macular hole surgery with air tamponade. Does air suffice for short-term tamponade?]." Ophthalmologie **107**(11): 1043-1050.

Ghoraba, H. H., A. F. Ellakwa und A. A. Ghali (2012). "Long term result of silicone oil versus gas tamponade in the treatment of traumatic macular holes." Clin Ophthalmol **6**: 49-53.

Grehn, F. (2012). Augenheilkunde. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.

Han, L., J. D. Cairns, W. G. Campbell, M. F. McCombe, W. J. Heriot und J. B. Heinze (1998). "Use of silicone oil in the treatment of complicated retinal detachment: results from 1981 to 1994." Aust N Z J Ophthalmol **26**(4): 299-304.

Hogan, M. J., J. A. Alvarado und J. E. Weddell (1971). Histology of the human eye : an atlas und textbook. Philadelphia, London, Saunders.

Hol, E. M. und M. Pekny (2015). "Glial fibrillary acidic protein (GFAP) und the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system." Curr Opin Cell Biol **32C**: 121-130.

Ivanovska-Adjievska, B., S. Boskurt, F. Semiz, H. Yuzer und V. Dimovska-Jordanova (2012). "Treatment of idiopathic macular hole with silicone oil tamponade." Clin Ophthalmol **6**: 1449-1454.

Khoroshilova-Maslova, I. P., M. K. Nabieva und N. L. Leparskaia (2012). "[Morphogenesis of complications after long-term intraocular silicon oil filling (clinical histopathological study)]." Vestn Oftalmol **128**(4): 57-61.

Kirchhof, B. (2007). Vitreo-retinal surgery. Berlin, Springer.

Kobuch, K., W. A. Herrmann, C. Framme, H. G. Sachs, V. P. Gabel und J. Hillenkamp (2008). "Maintenance of adult porcine retina und retinal pigment epithelium in perfusion culture: characterisation of an organotypic in vitro model." Exp Eye Res **86**(4): 661-668.

Lang, G. K., Esser, J., Gareis, O., Lang, G.E., Lang, S.J., Spraul, C.W., Wagner, P. (2014). Augenheilkunde. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag.

Lee, J. H., Y. D. Kim, K. I. Woo und M. Kong (2014). "Subconjunctival und orbital silicone oil granuloma (siliconoma) complicating intravitreal silicone oil tamponade." Case Rep Ophthalmol Med **2014**: 686973.

Lewis, G. P. und S. K. Fisher (2003). "Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling und a comparison to vimentin expression." Int Rev Cytol **230**: 263-290.

Li, L., H. J. Sheedlo und J. E. Turner (1993). "Muller cell expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in RPE-cell transplanted retinas of RCS dystrophic rats." Curr Eye Res **12**(9): 841-849.

Lucke, K. H., M. H. Foerster und H. Laqua (1987). "Long-term results of vitrectomy und silicone oil in 500 cases of complicated retinal detachments." Am J Ophthalmol **104**(6): 624-633.

Maier, M. M., V. Engelmann, S. Pfrommer, C. Perz und C. Lohmann (2011). "[Early emulsification of silicone oil (2000 cs) in minimally invasive transconjunctival vitreoretinal surgery]." Klin Monbl Augenheilkd **228**(5): 477-479.

Mateo-Montoya, A. und M. D. de Smet (2014). "Air as tamponade for retinal detachments." Eur J Ophthalmol **24**(2): 242-246.

Minuth, W. W., K. Schumacher, R. Strehl und S. Kloth (2000). "Physiological und cell biological aspects of perfusion culture technique employed to generate differentiated tissues for long term biomaterial testing und tissue engineering." J Biomater Sci Polym Ed **11**(5): 495-522.

Minuth, W. W., G. Stockl, S. Kloth und R. Dermietzel (1992). "Construction of an apparatus for perfusion cell cultures which enables in vitro experiments under organotypic conditions." Eur J Cell Biol **57**(1): 132-137.

Missotten, L., M. Appelmans und J. Michiels (1963). "[Ultrastructure of the Synapses of the Visual Cells of the Human Retina]." Bull Mem Soc Fr Ophthalmol **76**: 59-82.

Nakamura, K., M. F. Refojo, D. V. Crabtree und F. L. Leong (1990). "Analysis und fractionation of silicone und fluorosilicone oils for intraocular use." Invest Ophthalmol Vis Sci **31**(10): 2059-2069.

Odrobina, D. und I. Laudanska-Olszewska (2014). "Analysis of the time und location of the silicone oil emulsification by spectral-domain optical coherence tomography after silicone oil tamponade." Biomed Res Int **2014**: 372045.

Pastor, J. C., M. J. Del Nozal, P. Marinero und O. Diez (2006). "[Cholesterol, alpha-tocopherol, und retinoid concentrations in silicone oil used as a vitreous substitute]." Arch Soc Esp Oftalmol **81**(1): 13-19.

Petersen, J. (1987). "The physical und surgical aspects of silicone oil in the vitreous cavity." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **225**(6): 452-456.

Pinarci, E. Y., N. Yesilirmak, S. A. Bayar, S. Sizmaz, I. Akkoyun und G. Yilmaz (2013). "The results of pars plana vitrectomy und silicone oil tamponade for endophthalmitis after intravitreal injections." Int Ophthalmol **33**(4): 361-365.

Prause K., M. M. C., Haritoglou C., Messmer E.M., Kampik A., Wolf A., (2014). Intra- und subretinale Silikonöblagerungen in Augen mit langfristiger Silikonöltamponade. DOG 2014. Leipzig.

Rodrigues, E. B., H. Shiroma, F. M. Penha, M. Maia, M. N. Moraes-Filho, M. Ferreira, R. Portella, E. Novais, N. Hagedorn und M. E. Farah (2014). "Development und initial

experience with a colored perfluorocarbon liquid for intraocular tamponade in vitreoretinal surgery." Retina **34**(6): 1103-1111.

Romeis, B., M. Mulisch und U. Welsch (2010). Romeis Mikroskopische Technik. Dordrecht, Springer.

Sachsenweger, M. und V. Klauss (2014). Augenheilkunde [Elektronische Daten]. Stuttgart, Thieme.

Scholzen, T. und J. Gerdes (2000). "The Ki-67 protein: from the known and the unknown." J Cell Physiol **182**(3): 311-322.

Schonk, D. M., H. J. Kuijpers, E. van Druenen, C. H. van Dalen, A. H. Geurts van Kessel, R. Verheijen und F. C. Ramaekers (1989). "Assignment of the gene(s) involved in the expression of the proliferation-related Ki-67 antigen to human chromosome 10." Hum Genet **83**(3): 297-299.

Schumacher, K., R. Strehl, V. U. de und W. W. Minuth (2002). "Advanced technique for long term culture of epithelia in a continuous luminal-basal medium gradient." Biomaterials **23**(3): 805-815.

Schwartz, S. G., H. W. Flynn, Jr., W. H. Lee und X. Wang (2014). "Tamponade in surgery for retinal detachment associated with proliferative vitreoretinopathy." Cochrane Database Syst Rev **2**: CD006126.

Shen, Y. D. und C. M. Yang (2007). "Extended silicone oil tamponade in primary vitrectomy for complex retinal detachment in proliferative diabetic retinopathy: a long-term follow-up study." Eur J Ophthalmol **17**(6): 954-960.

Siqueira, R. C., A. D. Gil, F. Canamary, M. Minari und R. Jorge (2009). "Pars plana vitrectomy und silicone oil tamponade for acute endophthalmitis treatment." Arq Bras Oftalmol **72**(1): 28-32.

Teke, M. Y., M. Balikoglu-Yilmaz, P. Yuksekkaya, M. Citirik, U. Elgin, T. Kose und F. Ozturk (2014). "Surgical outcomes und incidence of retinal redetachment in cases with complicated retinal detachment after silicone oil removal: univariate und multiple risk factors analysis." Retina **34**(10): 1926-1938.

Teke, M. Y., U. Elgin, E. Sen, P. Ozdal und F. Ozturk (2014). "Intravitreal silicone oil induced changes in corneal biomechanics." Int Ophthalmol **34**(3): 457-463.

Triviño, A., B. Rojas, J. M. Ramírez, R. d. Hoz, B. I. Gallego, A. I. Ramírez und J. J. Salazar (2012). Effects of Hypercholesterolaemia in the Retina.

Tuccari, G., C. Trombetta, M. M. Giardinelli, F. Arena und G. Barresi (1986). "Distribution of glial fibrillary acidic protein in normal und gliotic human retina." Basic Appl Histochem **30**(4): 425-432.

Unbekannt (2013). ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit Gebrauchsanweisung. Z. System.

Wachtlin, J. und U. Kellner (2008). Retina: Diagnostik und Therapie von Erkrankungen des hinteren Augenabschnitts, Thieme.

Williams, R. L., M. J. Day, M. J. Garvey, G. Morphis, C. Irigoyen, D. Wong und T. Stappler (2011). "Injectability of silicone oil-based tamponade agents." Br J Ophthalmol **95**(2): 273-276.

Wong, D., J. C. Van Meurs, T. Stappler, C. Groenewald, I. A. Pearce, J. N. McGalliard, E. Manousakis und E. N. Herbert (2005). "A pilot study on the use of a perfluorohexyloctane/silicone oil solution as a heavier than water internal tamponade agent." Br J Ophthalmol **89**(6): 662-665.

Wu, K. H., P. L. Penfold und F. A. Billson (2002). "Effects of post-mortem delay und storage duration on the expression of GFAP in normal human adult retinae." Clin Experiment Ophthalmol **30**(3): 200-207.

Yang, W., Y. Yuan, Y. Zong, Z. Huang, S. Mai, Y. Li, X. Qian, Y. Liu und Q. Gao (2014). "Preliminary study on retinal vascular und oxygen-related changes after long-term silicone oil und foldable capsular vitreous body tamponade." Sci Rep **4**: 5272.

Yilmaz, T. und M. Guler (2008). "The role of nystagmus in silicone oil emulsification after pars plana vitrectomy und silicone oil injection for complex retinal detachment." Eur J Ophthalmol **18**(1): 150-154.

Zafar, S., S. A. Bokhari, Z. Kamil, M. Shakir, S. F. Rizvi und G. M. Memon (2013). "Outcomes of silicone oil removal." J Coll Physicians Surg Pak **23**(7): 476-479.

Zhou, C., Q. Qiu und Z. Zheng (2015). "Air versus gas tamponade in rhegmatogenous retinal detachment with inferior breaks after 23-gauge pars plana vitrectomy: A Prospective, Randomized Comparative Interventional Study." Retina.

14 Anhang

14.1 Morphologische Auswertung der Präparate

Morphologische Auswertung der immunhistologisch gefärbten Präparate anhand eines Ausschnittes des Netzhautgewebes in 20-facher Vergrößerung unterm Lichtmikroskop

| Versuchsgruppe | Beschreibung | Insgesamt präpariert | Verwertbare NH | Verwertbares RPE | GFAP +(MZ+) | % | Ki67 Proliferation im RPE + | % |
|----------------|--------------|----------------------|----------------|------------------|-------------|-----|-----------------------------|-----|
| V1 | NH +RPE +S | 23 | 18 | 21 | 15 | 83% | 15 | 33% |
| V2 | NH+RPE | 7 | 5 | 7 | 4 | 80% | 6 | 86% |
| V3 | RPE +S | 7 | 7 | 7 | / | 0% | 6 | 86% |

Tabelle 9

14.2 Statistische Auswertung mit SPSS

14.2.1 Mann-Whitney U Test: GFAP

Berechnung der statistischen Signifikanz der immunhistochemischen Anfärbung mit GFAP in VG 1 und VG 2

Ränge

| Type | H | Mittlerer Rang | Summe der Ränge |
|-----------------------|----|----------------|-----------------|
| GFAP Versuchsgruppe 1 | 18 | 12,08 | 217,50 |
| Versuchsgruppe 2 | 5 | 11,70 | 58,50 |
| Gesamtsumme | 23 | | |

Tabelle 10

Teststatistiken^a

| | GFAP |
|----------------------------------|-------------------|
| Mann-Whitney-U-Test | 43,500 |
| Wilcoxon-W | 58,500 |
| U | -,170 |
| Asymp. Sig. (2-seitig) | ,865 |
| Exakte Sig. [2*(1-seitige Sig.)] | ,914 ^b |

Tabelle 11

a. Gruppierungsvariable: Type

b. Nicht für Bindungen korrigiert.

14.2.2 Mann-Whitney U Test: Ki67

Berechnung der statistischen Signifikanz der immunhistochemischen Anfärbung mit Ki67 in VG 1 und VG 2

Ränge

| Type | H | Mittlerer Rang | Summe der Ränge |
|-----------------------|----|----------------|-----------------|
| Ki67 Versuchsgruppe 1 | 23 | 12,85 | 295,50 |
| Versuchsgruppe 2 | 7 | 24,21 | 169,50 |
| Gesamtsumme | 30 | | |

Tabelle 12

Teststatistiken^a

| | Ki67 |
|----------------------------------|-------------------|
| Mann-Whitney-U-Test | 19,500 |
| Wilcoxon-W | 295,500 |
| U | -3,309 |
| Asymp. Sig. (2-seitig) | ,001 |
| Exakte Sig. [2*(1-seitige Sig.)] | ,001 ^b |

Tabelle 13

Berechnung der statistischen Signifikanz der immunhistochemischen Anfärbung mit Ki67 in VG 2 und VG 3

Ränge

| Type | H | Mittlerer Rang | Summe der Ränge |
|-----------------------|----|----------------|-----------------|
| Ki67 Versuchsgruppe 2 | 7 | 7,50 | 52,50 |
| Versuchsgruppe 3 | 7 | 7,50 | 52,50 |
| Gesamtsumme | 14 | | |

Tabelle 14

Teststatistiken^a

| | Ki67 |
|----------------------------------|--------------------|
| Mann-Whitney-U-Test | 24,500 |
| Wilcoxon-W | 52,500 |
| U | ,000 |
| Asymp. Sig. (2-seitig) | 1,000 |
| Exakte Sig. [2*(1-seitige Sig.)] | 1,000 ^b |

Tabelle 15

- a. Gruppierungsvariable: Type
- b. Nicht für Bindungen korrigiert.

14.3 Färbemethoden

14.3.1 Methode der Entparaffinierung und HE Färbung

| | |
|----------------|--------------------|
| Xylol I | 10 Minuten |
| Xylol II | 10 Minuten |
| 100% EtOH | 10 Minuten |
| 100% EtOH | 10 Minuten |
| 90% EtOH | 10 Minuten |
| 80% EtOH | 10 Minuten |
| 70% EtOH | 10 Minuten |
| Aqua dest. | 10 Minuten |
| | |
| Hämalaun | 15 Minuten |
| Aqua dest. | 30 Sekunden spülen |
| Leitungswasser | 15 Minuten |
| Eosin | 30-60 Sekunden |
| | |
| 96% EtOH | 2 Minuten |
| 100% EtOH | 5 Minuten |
| 100% EtOH | 5 Minuten |
| Xylol | 10 Minuten |
| Xylol | 10 Minuten |

Tabelle 16

14.3.2 Methode der immunhistochemischen Färbung

| | |
|---|-------------|
| Aqua dest. | 5 Minuten |
| Kochen in Tarquet Rev Puffer bei 91°C (Nur Ki67 Färbung) | 30 Minuten |
| Kühlen lassen im Puffer | 30 Minuten |
| Waschen mit Aqua dest. | 2-3 Minuten |
| Blocken der endogenen Peroxidase in 70% EtOH + 3% H2O2 | 10 Minuten |
| Waschen mit PBS | 2-3 Minuten |
| Superblock | 5 Minuten |
| Inkubieren in primärem Antikörper (1:100 verdünnt) | 45 Minuten |
| Waschen mit PBS | 2-3 Minuten |
| Inkubieren in sekundärem Antikörper | 20 Minuten |
| Waschen mit PBS | 2-3 Minuten |
| Inkubieren in HRP-Konjugat | 20 Minuten |
| Waschen mit PBS | 2-3 Minuten |
| Waschen mit PBS | 2-3 Minuten |
| Inkubieren in ACE-Komplex | 5 Minuten |
| Inkubieren in ACE-Komplex | 5 Minuten |
| Stoppen mit Aqua dest. | 1 Minute |
| Kurze Gegenfärbung mit Hämatoxylin | 1 Minute |
| Stoppen mit Aqua dest. | 1 Minute |
| Bläuen in Leitungswasser | 1 Minute |
| In Aqua dest. stellen und mit Aqua TEX eindecken | |

Tabelle 17

14.4 Materialien

14.4.1 Material für die ex-vivo Präparation von einem Schweineauge

| | | |
|---------|--|---------------------------|
| | 0,9% NaCl Lösung | Von der Apotheke |
| | PBS | Fa. PIAA |
| 1 | Enukleationsschere | Fa. Aesculab |
| 1 | Sklerapinzette | Fa. Aesculab |
| 1 | Stumpfe Pinzette | Fa. Aesculab |
| 1- 2 | Zigarettentupfer | Fa. Lohmann & Rauscher |
| 1 | Pipette oder 10 ml Spritze | |
| 2 | Muldkompressen | Fa. Lohmann & Rauscher |
| 3 | Einmal-Injektions-Kanülen, Größe 1, Sterican® | Fa. B. Braun |
| 1 | Feather® Disposable Scalpel, No. 11 | Fa. Feather |
| 1 | Styroporplatte | |
| 1 | Doppelring System | Fa. Minucells |
| | 1er bzw. 6er Minucell Perfusionskammern | Fa. Minucells |
| 1 | Kleine Petrischalen zur temporären Aufbewahrung der präparierten Ringe in Medium | |
| | Operationsmikroskop Universal S3 | Fa. Zeiss |

Tabelle 18

14.4.2 Zusammensetzung des Mediums für die Perfusion

| | |
|---|-------------------|
| 500ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit 4500 mg Glucose/L, pyridoxine, HCl und NaHCO ₃ | Fa. Sigma-Aldrich |
| 15% tiefgefrorenes steriles porkines Serum | Fa. Sigma-Aldrich |
| 1% Penicillin Streptomycin tiefgefroren | Fa. Gibco |
| 2,5% gekühltes HEPES Pufferlösung, 1 M in H ₂ O | Fa. Sigma-Aldrich |

Tabelle 19

14.4.3 Material für die Perfusion einer Gradienten-Perfusionslinie

| | | |
|---|--|-----------------------------|
| | 2 identische Perfusionslinien 1 oben, 1 unten mit je: | |
| | | |
| 2 | 500ml Schottflaschen | Fa. Nalgene |
| 2 | Verschlusskappen Kunststoff weiß mit je 1 Luftfilter PTEE 0,22 µm Porengröße, innen 18 cm Silikonschlauch, ID 3mm (Meterware) + Glasendstück 3 cm lang | Fa. Novo direkt |
| 3 | 50 cm Silikonschläuche Meterware | Fa. Novo direkt, T 31251 |
| | | |
| | Mit je 2 männlichen Fittings | Fa. Novo direkt, T 95956 |
| 1 | Pumpenschlauch ID 1,02 mm (weiß/weiß) aus Silikon | Fa. Novo direkt, T 31473 |
| | | |
| | Mit je 2 weiblichen Fittings | Fa. Novo direkt, T 95960 |
| 1 | Gradienten-Perfusionskammer für 1 Präparat | Fa. Minucells |
| | | |
| 1 | Wärmeplatte | Fa. Störk Tronic, Fa. Medax |
| 4 | Eisbeutel | |

Tabelle 20

14.4.4 Material für die Reinigung der Perfusionskammern, Schläuche und Flaschen

| | | |
|---|--|---------------------|
| 1 | 1% Stammopur 24 zur Reinigung im Ultraschallbad und ausspülen der Flaschen | Fa. DR-H-STAMM GmbH |
| 1 | 10ml Spitze Ethanol Absolut 99,8% | Von der Apotheke |
| 1 | 10ml Spitze Aqua dest. | |
| 1 | 10ml Spritze leer bzw. luftgefüllt | |
| 1 | Autoklav | Fa. Systec |

Tabelle 21

14.4.5 Material für die Herstellung von Paraffinschnitten

| | | |
|---|--|-----------------------|
| | 4% PFA | |
| 1 | Pipette zum befeuchten | |
| 1 | Rasiermesser | Fa. Wilkinson |
| 1 | Microsurgical knife Sharpoint® | Fa. Sharpoint |
| 1 | Gezahnte Pinzette | Fa. Aesculab |
| | Kleingeschnittene Taschentücher | Fa. Kleenex |
| 1 | Petrischale mit gehärtetem Paraffin | |
| 1 | Einbettkassetten + Schwämme | Fa. Roth |
| 1 | Urinbecher zur Aufbewahrung der in PFA gebetteten Histokassetten | |
| 1 | Einbettautomat | Fa. Thermo Scientific |
| 1 | Entwässerungsautomat | Fa. Shandon |
| 1 | Kühlplatte | Fa. Medite |
| 1 | Mikrotom | Fa. Thermo Scientific |
| 1 | Streckbad | Fa. GFL |

Tabelle 22

14.4.6 Material für die HE Färbung

| | |
|-----------------------|------------------|
| Mayer's Hämatoxylin | Fa. Sigma |
| Eosin | Fa. Sigma |
| Xylol 1 | |
| Xylol 2 | |
| Ethanol Absolut 99,8% | von der Apotheke |
| Aqua dest. | |
| Leitungswasser | |
| Objektträger | Fa. Menzel |

Tabelle 23

14.4.7 Material für die indirekte immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten

| | |
|--|-------------|
| Target Retrieval Solution (Target Puffer nur bei Ki67 Färbung) | Fa. Dako |
| Peroxidblock aus: 70% EtOH + 3% H ₂ O ₂ | Fa. ZytoMed |
| Aqua dest. | |
| | |
| ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit mit: | Fa. ZytoMed |
| 6 ml Blocking Solution (Superblock), (blau) | Fa. ZytoMed |
| 6 ml PostBlock (gelb) | Fa. ZytoMed |
| 6ml HRP Polymer (rot) | Fa. ZytoMed |
| | |
| Primärer Antikörper 1:100 verdünnt mit Antikörper diluent (grün) | Fa. ZytoMed |
| Sekundärer Antikörper | Fa. ZytoMed |
| AEC | Fa. ZytoMed |
| | |
| PBS | Fa. PIAA |
| Mayer's Hämatoxylin | Fa. Sigma |
| Leitungswasser | |
| Aqua TEX | Fa. ZytoMed |
| Deckgläser | Fa. Menzel |
| Wasserbad | Fa. GFL |

Tabelle 24

14.4.8 Instrumente zur Auswertung der Histologie

| | |
|------------------------------|-----------|
| Lichtmikroskop | Fa. Zeiss |
| Kamera mit Mikroskop Aufsatz | Fa. Canon |

Tabelle 25

15 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof Dr. med. Mathias Maier für die Ermöglichung dieser wissenschaftlichen Dissertation an der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde am Klinikum rechts der Isar sowie für die zahlreichen Korrekturen und monatlichen Doktorandentreffen.

Ganz besonders möchte ich mich bei auch bei Frau Dr. med. Karin Kobuch und Frau Petra Eberl für die Unterstützung und Betreuung im Labor bedanken ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei der Firma Fluoron für die Bereitstellung der Silikonöle und die finanzielle Unterstützung, die es mir ermöglicht hat meine Arbeit auf der ARVO 2015 in Denver zu präsentieren.

Besonderer Dank gilt auch meiner Schwester Elisabeth Neuer, die mir mit viel Geduld bei der statistischen Auswertung geholfen hat.

Ich danke auch Fabian Göddert für das Interesse an meiner Arbeit und die schöne anatomische Zeichnung des Auges.

Zuletzt möchte ich diese Arbeit meinen Eltern widmen, für ihre bedingungslose Liebe und Unterstützung auf allen Lebenswegen.