

**Kollagenfolie als Träger zur Transplantation von Zellen im
subretinalen Raum für den Ersatz des RPE in AMD**

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Uswatta Liyanage Dilini Chrischon Madhurangi Frank, geb. Perera

aus

Marawila (Sri Lanka)

Berichter: Frau Universitätsprofessorin
Dr. med. Gabriele Thumann

Herr Privatdozent
Dr. med. Michael Pinkawa

Tag der mündlichen Prüfung: 12. April 2011

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek
online verfügbar.

Meiner Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 Anatomie des menschlichen Auges	1
1.1.1 Allgemeiner Aufbau der Netzhaut	2
1.1.2 Das retinale Pigmentepithel und die Bruch'sche Membran	4
1.1.3 Das Kaninchenauge	7
1.2 Kollagen – ein natürliches Implantatmaterial	8
1.2.1 Bedeutung von Kollagen als Biomaterial	8
1.2.2 Einsatz von Kollagen als Träger für Zellen	9
1.3 Altersbedingte Makuladegeneration (AMD)	11
1.3.1 Ursachen und Krankheitsbild der AMD	11
1.3.2 Aktuelle Therapiekonzepte der AMD	12
1.3.3 AMD-Therapie durch PE-Transplantation	15
2 ZIELSETZUNG	17
3 MATERIAL UND METHODEN	18
3.1 Physikochemische Eigenschaften der Kollagenfolie	18
3.1.1 DTAF-Färbung von Kollagenfolien	18
3.2 Besiedlung von Kollagenfolien mit RPE für die Transplantation	19
3.2.1 ARPE19 Kultur	19
3.2.2 Besiedlung von Kollagenfolie mit ARPE19-Zellen	19
3.2.3 Vorbereitung der Kollagenfolie für die Implantation	20
3.3 Versuchstiere	20
3.3.1 Tierhaltung	21
3.4 Operation und Narkoseverfahren	22
3.4.1 Narkoseverfahren	22
3.4.2 Operativer Eingriff	22
3.4.3 Postoperative Behandlung und Verlaufskontrolle	24
3.5 Makroskopische Aufarbeitung der Augen	24
3.5.1 Enukleation und Fixierung	24
3.5.2 Makroskopischer Zuschnitt	25
3.6 Histologische Aufarbeitung der Augen	25
3.6.1 Einbettung in Paraffin	25

3.6.2	Herstellung von Schnittpräparaten mittels Dünnschnitttechnik	26
3.6.3	HE-Färbung von Schnittpräparaten	26
3.6.4	Mikroskopie	27
3.7	Materialien und Geräte	28
3.7.1	Untersuchungsmaterial	28
3.7.2	Zellkultur	28
3.7.3	Operation und Narkose	29
3.7.4	Makroskopische Aufarbeitung der Augen	30
3.7.5	Histologische Aufarbeitung der Augen	31
3.7.6	Software	31
3.7.7	Geräte	32
4	ERGEBNISSE	33
4.1	Makroskopie der subretinal transplantierten Kollagenfolie mit ARPE-19-Zellen	35
4.2	Histologie der subretinal transplantierten Kollagenfolie mit ARPE-19-Zellen	37
4.3	Abbauverhalten der Kollagenfolie mit ARPE-19-Zellen	39
4.4	Aufnahmen der Ergebnisse	41
4.4.1	Histologie: Kollagenfolie mit RPE-Zellen im subretinalen Raum (follow up: 3 Tage)	41
4.4.2	Histologie: Kollagenfolie mit RPE-Zellen im subretinalen Raum (follow up: 7 Tage)	42
4.4.3	Histologie: Kollagenfolie mit RPE-Zellen im subretinalen Raum (follow up: 14 Tage) ...	43
4.4.4	Histologie: Kollagenfolie mit RPE-Zellen im subretinalen Raum (follow up: 21 Tage) ...	44
4.4.5	Histologie: Kollagenfolie mit RPE-Zellen im subretinalen Raum (follow up: 35 Tage) ...	45
4.4.6	Angiographische Aufnahmen nach 3 und 35 Tagen	46
5	DISKUSSION	47
6	ZUSAMMENFASSUNG	54
7	LITERATURVERZEICHNIS	55
	DANKSAGUNG	75
	ERKLÄRUNG § 5 ABS. 1 ZUR DATENAUFBEWAHRUNG	76
	LEBENS LAUF	77

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
Abb.	Abbildung
ad	bis, mit
AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
Aqua bidest.	Aqua bidestillata (bidestilliertes Wasser)
ARPE19	Immortalisierte humane RPE-Zelllinie
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
CNV	Choroidale Neovaskularisation
CO ₂	Kohlendioxid
Col I	Kollagen Typ I
d	Tag(e)
DTAF	Dichlorotriazinylaminofluorescein
ELM	External limiting membrane (äußere limitierende Membran)
et al.	et alteri (und andere)
Fa.	Firma
FGF	Fibroblast Growth Factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
Formalin	Paraformaldehyd
g	Gramm
GCL	Ganglion cell layer (Ganglienzellschicht)
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
HE	Hämalaun-Eosin
H ₂ O	Wasser
I.E.	Internationale Einheit(en)
ILM	Inner limiting membrane (innere limitierende Membran)
INL	Inner nuclear layer (innere Körnerzellschicht)
IPL	Inner plexiform layer (innere plexiforme Schicht)
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
lat.	Latein
M	Molar, 10 ⁻³ Mol pro Liter
MEM	Minimum Essential Medium (Zellkulturmedium)
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mol	Mol
monokl.	Monoklonal

mm	Millimeter
mM	Millimolar
mm ²	Quadratmillimeter
mRNA	Messenger RNA
ms	Millisekunde
MTP	Mikrotiterplatte
µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
NCS	New born calf serum (Kälberserum)
NFL	Nerv fiber layer (Nervenfaserschicht)
NGS	Normal goat serum (Ziegenserum)
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
ONL	Outer nuclear layer (äußere Körnerzellschicht)
OP	Operation(en)
OPL	Outer plexiform layer (äußere plexiforme Schicht)
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PDGF	Platelet-derived Growth Factor (thrombozytärer Wachstumsfaktor)
PE	Pigmentepithel
PEDF	Pigmentepithelium-derived Factor (Pigmentepithel-Wachstumsfaktor)
PFCL	Perfluorocarbon
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Rod outer segments (Photorezeptoraußensegmente)
RPE	Retinales Pigmentepithel
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur (21°C)
s	Sekunde
SL	Stammlösung
sog.	sogenannt
t	Zeit
U	Unit (Einheiten)
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (vaskulär-endothelialer Wachstumsfaktor)
v/v	Volume per volume (Konzentrationsangabe in Volumenprozent)
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1 EINLEITUNG

1.1 Anatomie des menschlichen Auges

Das Auge (Abb. 1, lat. Oculus), in der knöchernen Augenhöhle (Orbita) gelegen, ist das zentrale Sinnesorgan für die Wahrnehmung von Lichtreizen, welches das Sehen ermöglicht. Der lichtempfindliche Anteil des Auges entsteht entwicklungsgeschichtlich aus dem Zwischenhirn.

Das durch die durchsichtige Hornhaut (Cornea) in das Auge eintretende Licht projiziert sich durch die Linse (Lens cristallina) und den Glaskörper (Corpus vitreum), eine zum größten Teil aus Wasser bestehende, klare geleeartige Flüssigkeit, hindurch auf die Netzhaut (Retina). Die Regenbogenhaut (Iris) reguliert über die Größe ihrer zentralen Öffnung, der Pupille, das einfallende Licht.

In dem spezialisierten sensorischen Gewebe der Retina wird der physikalische Reiz Licht in elektrochemische Signale umgewandelt und über den Sehnerv (Nervus opticus), der sich medial der optischen Achse befindet, an das Gehirn weitergeleitet und dort verarbeitet. Das retinale Pigmentepithel absorbiert mit seinem Farbstoff Melanin das durch die Retina hindurch tretende Streulicht.

Am Auge können zwei Räume unterschieden werden. Durch die Begrenzung der Cornea, der Iris und der Linse entsteht die vordere Augenkammer. Der ringförmige Raum, der die Linse umgibt, bildet die hintere Kammer. Das Augeninnere wird durch den Glaskörper, Corpus vitreum gefüllt.

Die äußere Schicht besteht aus einer festen Lederhaut (Sklera), eine vorwiegend aus kollagenen und einigen elastischen Fasern aufgebaute dehnungsfeste Bindegewebskapsel, welche zusammen mit dem intraokularem Druck der Stabilisierung der Form des Augapfels (Bulbus oculi) dient.

Zwischen der Sklera und Retina befindet sich die Aderhaut (Chorioidea), die zusammen mit dem retinalen Gefäßsystem die Blutversorgung des Auges gewährleistet und im vorderen Abschnitt in die Iris und den Ziliarkörper übergeht. Die Netzhaut enthält in dem Abschnitt zur Papille hin, Pars optica, die lichtempfindlichen Sinneszellen, in ihrem vorderen Abschnitt, Pars caeca, Pigmentepithel. Der Übergang zwischen den beiden Retinaabschnitten wird als Ora serrata bezeichnet. (Quelle: Taschenatlas der Anatomie, 3 Nervensystem und Sinnesorgane; Werner Kahle, Georg Thieme Verlag)

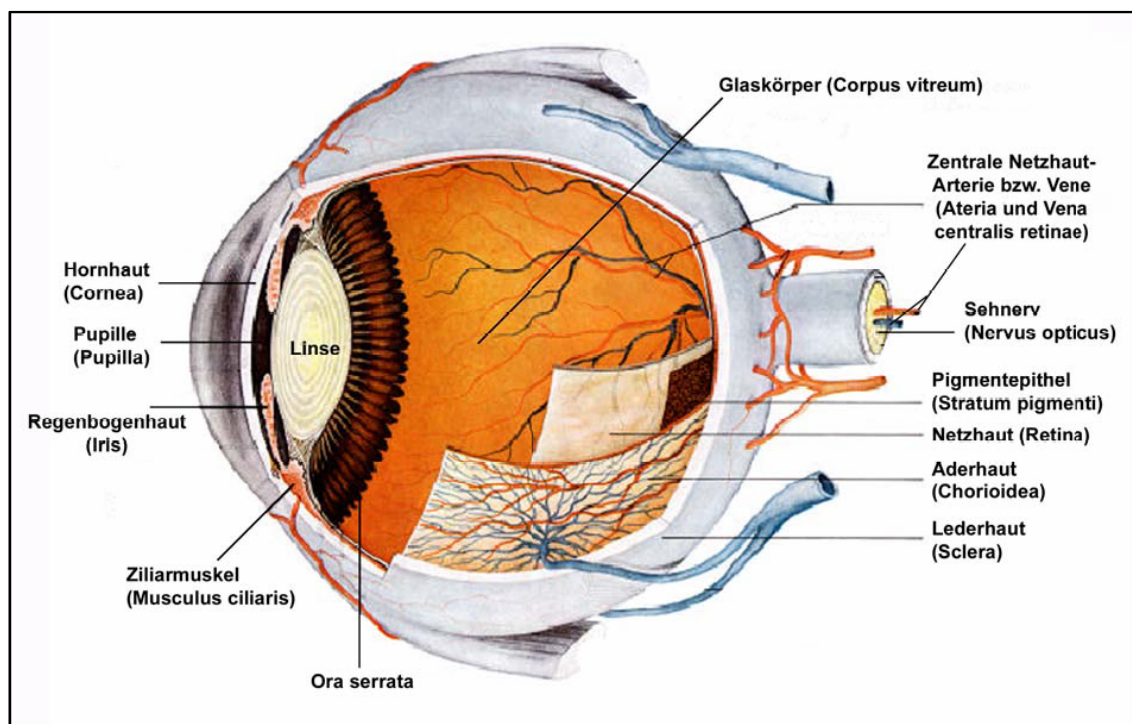


Abb. 1: Schichtgliederung des menschlichen Auges (Quelle: <http://www.anatom.uni-tuebingen.de/docs/MolHistoSS2004/XXAugeRetina.pdf>, modifiziert nach Mikroskopische Anatomie der Organe – Auge und Retina; H.-J. Wagner)

1.1.1 Allgemeiner Aufbau der Netzhaut

Die Retina hat eine mittlere Dicke von etwa 200 µm und besteht aus einem vielschichtigen neuronalen Netzwerk mit Stütz- und Pigmentepithelzellen. In der Pars optica retinae wird die Verbindung zwischen der Neuroretina und dem retinalen Pigmentepithel über den Kontakt der Mikrovilli des retinalen Pigmentepithels mit den

Photorezeptoraußensegmenten aufrecht erhalten. Die einzigen festen Verbindungen der Neuroretina an das retinale Pigmentepithel befinden sich an der Ora serrata und im Bereich der Austrittsstelle des Sehnervs, des Discus nervi optici (Blinder Fleck).

Das in das Auge einfallende Licht trifft als ein physikalischer Reiz auf die Netzhaut und löst an den dort vorhandenen Photorezeptoren einen Impuls aus. Die Verarbeitung und Weiterleitung der so aufgenommenen Bildinformationen erfolgt in der Weise, dass diese innerhalb der Netzhaut durch neuronale Verschaltungen gefiltert, stufenweise gebündelt und über den Nervus opticus zum visuellen Kortex im Zwischenhirn weitergeleitet wird.

Die Säugetiernetzhaut kann von innen nach außen in zehn einzelnen Schichten eingeteilt werden (Abb. 2). Die innere Oberfläche der Retina wird durch eine Basalmembran, die innere limitierende Membran, Membrana limitans interna (inner limiting membrane, ILM) vom Glaskörper getrennt. Die äußere limitierende Membran, eine Gliamembran, Membrana limitans externa (external limiting membrane, ELM), grenzt im Neuroepithel die rezeptorischen Abschnitte der Sinneszellen ab. Zwischen beiden Membranen erstrecken sich die Müller-Stützzellen, die mit langen blattartigen Fußfortsätzen versehen sind.

Die Photorezeptorschicht, die 1. Neuronschicht in der Sehleitung, besteht aus zwei verschiedenen Sinneszellen, den Stäbchenzellen und den Zapfenzellen. Während die Stäbchen für die Hell-Dunkel-Empfindlichkeit in der Dämmerung zuständig sind, ermöglichen die Zapfen das Farbsehen. Die Zellkerne der Photorezeptoren bilden die äußere Körnerzellschicht (outer nuclear layer, ONL).

Die innere Körnerzellschicht (inner nuclear layer, INL), die 2. Neuronschicht der Sehleitung, enthält bipolare Schaltzellen, welche zu den Photorezeptorzellen ziehen und mit ihren terminalen Ästen an den Endkolben der Rezeptoren enden. Die Axone der inneren Körnerzellen haben Kontakt mit den großen Neuronen der Ganglienzellschicht.

Die Ganglienzellschicht (ganglion cell layer, GCL), die 3. Neuronschicht der Sehleitung, besteht aus einer Reihe großer multipolarer Nervenzellen, deren kurze Dendriten mit der inneren plexiformen Schicht mit den Axonen der inneren Körnerzellen Synapsen bilden. Die Synapsen liegen in kernfreien Zonen zwischen den Zellschichten, die als äußere plexiforme Schicht (outer plexiforme layer, OPL) und

innere plexiforme Schicht (inner plexiforme layer, IPL) bezeichnet werden. Assoziationszellen bilden Querverbindungen in der OPL durch die Horizontalzellen und in der IPL durch Amakrinzellen. (Quelle: Taschenatlas der Anatomie, 3 Nervensystem und Sinnesorgane; Werner Kahle, Georg Thieme Verlag)

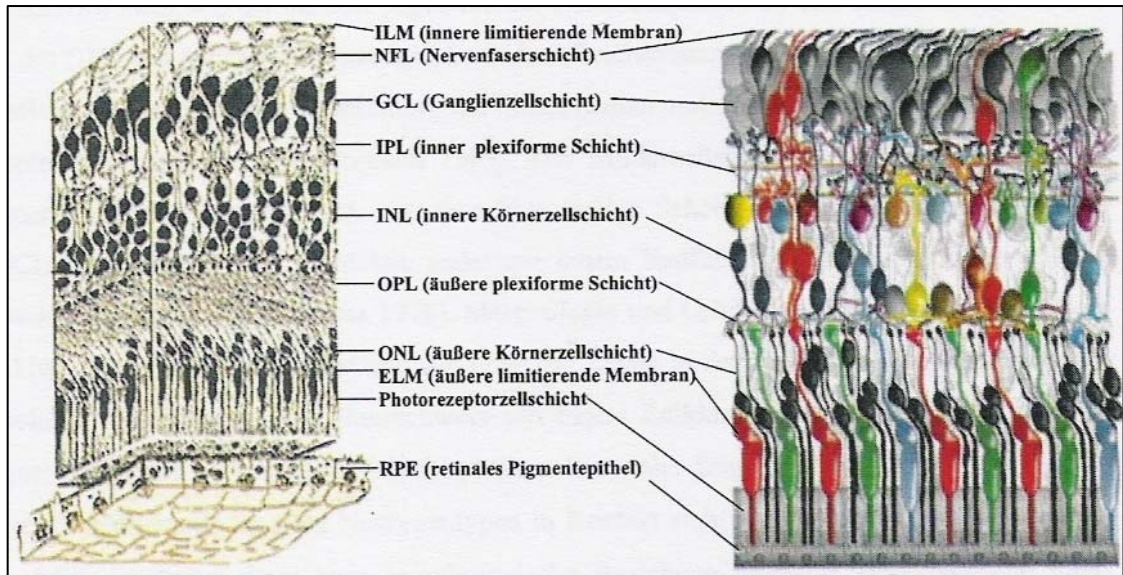


Abb. 2: Darstellung der humanen Netzhaut links. Schematische Darstellung der Netzhaut rechts. (Quelle: Webvision)

1.1.2 Das retinale Pigmentepithel und die Bruch'sche Membran

Das retinale Pigmentepithel (RPE), bestehend aus einer einschichtigen pigmentierten Zellschicht, ist so wie die Bruch'sche Membran Anteil der Blut-Retina-Schranke [Bok 1993; Rizzolo 1997]. Die RPE-Zellen stehen mit ihrer apikalen Seite durch Mikrovilli mit den ersten Neuronen der Sehbahn in engem Kontakt, während die basolaterale Seite der Bruch'schen Membran anliegt, welche wiederum das RPE in Richtung der fenestrierten Aderhautschicht abschirmt [Marmor & Wolfensberger 1998].

Ein intaktes retinales Pigmentepithel ist Grundvoraussetzung zur Erhaltung der äußeren neuralen Retina und Choriokapillaris [Strauss 2005]. Das RPE absorbiert, als eine Schicht aus pigmentierten Zellen, das auf die Netzhaut fallende Streulicht [Boulton & Dayhaw-Barker 2001]. Der Transport der im subretinalen Raum anfallende Ionen, Wasser und der metabolischen Endprodukte in den Blutkreislauf sowie Nährstoffe wie

Glucose, Retinoide und Fettsäuren aus dem Blutkreislauf zu den Photorezeptorzellen gehört zu den Funktionen der RPE-Zellen [Steinberg 1985; Baehr et al. 2003].

Das Retinal in den Photorezeptorzellen ist als 11-cis-Retinal essentiell am Sehvorgang beteiligt, wobei das ins Auge fallende Licht zur Umwandlung des 11-cis-Retinals in all-trans-Retinal führt. Das all-trans-Retinal wird durch das RPE aufgenommen, in das 11-cis-Retinal reisomerisiert und zu den Photorezeptorzellen rücktransportiert, da diese zur Reisomerisation des Retinals nicht befähigt sind. Auch die zur Aufrechterhaltung der Erregbarkeit der Photorezeptorzellen notwendige Zusammensetzung des ionischen Milieus im subretinalen Raum wird durch das RPE reguliert [Steinberg et al. 1983; Steinberg 1985].

Zu den physiologischen Funktionen des RPE gehört ebenfalls die Phagozytose von abgeschnürten Photorezeptoraußensegmenten, wobei diese verarbeitet und dabei essentielle Substanzen wie Retinal wiederaufbereitet werden, um anschließend erneut zu den Photorezeptoren zurückgeführt zu werden [Gal et al. 2000; Finnemann 2003].

Weiterhin werden verschiedene Wachstumsfaktoren wie beispielsweise Fibroblast Growth Factor (FGF), Platelet-derived Growth Factor (PDGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) sowie Pigmentepithelium-derived Factor (PEDF) vom RPE sezerniert, die der Aufrechterhaltung des strukturellen Zusammenhalts und der gemeinsamen Funktionalität zwischen RPE und der daran angrenzenden Choriokapillaris sowie den Photorezeptoren gewährleisten [Bost et al. 1994; Campochiaro et al. 1994; Kuroki et al. 1996; Nagineni et al. 2003; Ogata et al. 2002; Witmer et al. 2003; Miyamoto et al. 2008].

Die etwa 2 – 3 µm dicke Bruch'sche Membran besteht aus fünf Schichten (von außen nach innen): Basalmembran der Gefäße der Choriokapillaris, äußere Kollagenfaserschicht, elastische Faserschicht, innere Kollagenfaserschicht und Basalmembran der RPE-Zellen. Sie setzt sich in der Basalmembran der Choriokapillaris aus Kollagen Typ IV, V und VI sowie Laminin, im Bereich der Kollagenfaserschichten aus Kollagen Typ I, III und V, in der elastischen Faserschicht aus Elastin, Kollagen Typ VI, Fibronectin und in der Basalmembran des RPE aus Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin zusammen, wobei alle Schichten noch diverse Glykosaminoglykane

beinhalten [Hewitt et al. 1989, Marmor & Wolfensberger 1998, Strauss 2005, Aisenbrey et al. 2006b].

Die zwischen dem RPE und der Choriokapillaris gelegene Bruch'sche Membran gewährleistet durch ihre Semipermeabilität einen kontrollierten Hin- und Rücktransport für Nährstoffe, Elektrolyte und andere Moleküle von und zur Netzhaut. Aufgrund des azellulären Aufbaus der Bruch'schen Membran sind diese Vorgänge primär passiv reguliert. Die selektive Permeabilität ist auf die molekulare Zusammensetzung der Membran zurückzuführen, welche von verschiedenen Faktoren wie dem Alter, Umwelteinflüsse, genetische Konstitution, der Lokalisation in Bezug auf die Retina sowie dem Gesundheitszustand beeinflusst werden [van Soest et al. 2007, Bhutto et al. 2008, Booij et al. 2009].

Funktionell dient die Bruch'sche Membran zur Adhäsion und zur Differenzierung der RPE-Zellen [Del Priore & Tezel 1998, Gong et al. 2008]. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass eine Wundheilung durch Zellmigration bzw. Zellproliferation bei intakter Bruch'scher Membran deutlich effizienter ablief, als bei beschädigter oder fehlender Bruch'scher Membran [Wang H et al. 2003].

Die Entstehung sowie die Aufrechterhaltung der extrazellulären Matrix der Bruch'schen Membran hängen im Wesentlichen vom RPE und der Choriokapillaris ab. Der Transport diverser Biomoleküle sowie Abfallprodukte zwischen RPE und Choriokapillaris beeinflusst sowohl die Struktur als auch die Funktionen der Bruch'schen Membran. Das RPE und die Choriokapillaris sind beide befähigt, Proteine der Bruch'schen Membran zu produzieren, wie beispielsweise Kollagene, Fibronektine und Proteoglykane [van Soest et al. 2007, Booij et al. 2010].

Aufgrund seiner vielfältigen und komplexen Funktionen ist das auf der Bruch'schen Membran adhärierende RPE in seiner sensiblen Lage zwischen der Retina und dem Körperkreislauf insbesondere für die visuelle Funktion des Auges essentiell. Das Versagen auch nur einer dieser Funktionen würde zur Degeneration der Netzhaut und zum Verlust ihrer visuellen Funktion und somit zur Blindheit führen.

1.1.3 Das Kaninchenauge

Im Vergleich zu Augen vom Menschen oder Schweinen ist beim Kaninchenauge bei Traumatisierung eine ausgeprägtere Gewebs- und Immunreaktion zu erwarten, was eine sensiblere Beurteilung der Bioverträglichkeit von Materialien sowie angewandter Operationstechniken erlaubt [Klein & Bito 1983].

Im Gegensatz zu den morphologisch kleinen Mäuse- oder Rattenaugen ermöglichen die vergleichsweise großen Kaninchenaugen einen leichteren operativen Zugang und eine bessere Übersicht während der Operation. Ebenso vereinfacht die Möglichkeit der Verwendung einer alleinigen intramuskulären Narkose bei Kaninchen den operativen Vorgang, wobei der zeitliche Ablauf verkürzt und der technische Aufwand durch Wegfall der Beatmung sowie der Katheterisierung, wie zum Beispiel beim Schwein als Versuchstier mit vergleichsweise ähnlich großen Augen benötigt, vermindert wird.

Das Kaninchenauge ist dem menschlichen Auge morphologisch und physiologisch sehr ähnlich. Die Unterschiede zwischen dem humanen und dem Kaninchenauge betreffen hauptsächlich die Vaskularisierung der Netzhaut.

Anstelle der Makula mit Fovea centralis als der Bereich des schärfsten Sehens beim Menschen ist beim Kaninchenauge ein Streifen erhöhter Ganglienzelldichte (visual streak) zu finden, der sich horizontal oberhalb der Papille befindet [Davis 1929]. Während die menschliche Netzhaut vaskularisiert ist, sind beim Kaninchen die Blutgefäße nur im papillären Bereich, in dem Bereich der *fibrae medullaris*. Der Rest der Retina ist avaskulär. Der Bereich der *fibrae medullaris*, auch *medullary rays* genannt, ist der einzige Bereich beim Kaninchen, in dem Astrozyten vorkommen, im Gegensatz zur Netzhaut des Menschen, in der sich bis weit in die Peripherie Astrozyten befinden. So zeigen sich im papillären Bereich des Kaninchens die Nervenfasern der Ganglienaxone vor dem Austritt als Sehnerv bereits myelinisiert. Weiterhin ist eine deutliche Dickenabnahme der Netzhaut zur Peripherie hin in der Kaninchenretina gegenüber der humanen Netzhaut festzustellen [Davis 1929; Oyster et al. 1981].

Diese Unterschiede spielen im Rahmen dieser Versuchsreihe keine relevante Rolle, sind jedoch unter makroskopischer und mikroskopischer Sicht erkennbar.

1.2 Kollagen – ein natürliches Implantatmaterial

1.2.1 Bedeutung von Kollagen als Biomaterial

Für zahlreiche medizinische Anwendungsgebiete werden biodegradierbare, körperverschmelzbare Implantatmaterialien benötigt. Der Bereich des Tissue Engineering, die Entwicklung biokompatibler und degradierbarer Materialien *in vitro*, gewinnt daher immer mehr an Bedeutung. Derzeit wird aus Polymeren, Fibrin, Chitosan und Kollagen eine Vielzahl unterschiedlichster Implantate hergestellt [Takemoto et al. 2008; Itosaka et al. 2009; Ishikawa et al. 2009; Tucker et al. 2010].

Zur Transplantation von Zellen müssen die Implantate den Zellen eine Matrix bieten, an der sich die Zellen adhären, bzw. hineinwachsen, proliferieren und sich differenzieren können. Vor allem kollagene Matrices als Substrat für kultivierte Zellen oder als dreidimensionaler Gewebeersatz stehen dabei im Vordergrund [Park et al. 2002; Wahl et al. 2007; Stadler et al. 2008; Yow et al. 2008; Khoshfetrat et al. 2009].

Die Eigenschaft des Kollagens, sich zu verschiedenen Formen verarbeiten zu lassen wie z. B. zu Platten, Pulver, Gele, Schwämme und Puder, ermöglicht die Anwendung bei verschiedensten medizinischen Applikationen [Goissis et al. 1999; Groning et al. 2007; Gugala et al. 2007; Hadjipanayi et al. 2008; Tedder et al. 2008; Takemoto et al. 2008].

In der Ophthalmologie können Kollagenstrukturen als Medikamententräger [Rubin et al. 1973; Bloomfield et al. 1978; Punch et al. 1987;] und zur Defektdeckung bei Hornhautschäden in Kombination mit cornealen Keratinocyten, corneale Epithelzellen und Endothelzellen [DeVore et al. 1995; Orwin & Hubel 2000; Doillon et al. 2003; Mimura et al. 2004; Nakamura et al. 2004] und ebenfalls als Träger für Zellen zur Transplantation im subretinalen Raum wie in dieser Arbeit verwendet werden [Ohno-Matsui et al. 2006; Thumann et al. 2009].

Kollagene Materialien sind als Gewebe- und Volumenersatz nach Verbrennungen, bei postoperativen Defekten oder Tumorddefekten geeignet [Wanke et al. 1966, Ng et al. 2004; Schonleben et al. 2006; Jehle & Rohatgi 2007]. Kollagenfasergeflechte und Schwammstrukturen finden bei Nervendegenerationen [Gingras et al. 2003; Alluin et al.

2009], bei Gefäßrekonstruktionen [Huynh et al. 1999; Tillman et al. 2009; Hon et al. 2009], als Knochengewebsimplantat [Zou et al. 2005; Wong & Rabie 2006; Issa et al. 2008], bei Substitution der Mundschleimhaut [Ophof et al. 2002] sowie in weiteren medizinischen Anwendungsgebieten [Chevapil 1977; Jansen et al. 2008; Sarkar & Yong 2009; van Tienen et al. 2009] ihren Einsatz.

Aus Kollagen hergestellte Biomaterialien besitzen aufgrund der Ähnlichkeit zu humanem Gewebe zahlreiche Vorteile gegenüber synthetisch hergestellten Materialien [Khor 1997]. Insbesondere die gute Bioverträglichkeit und die Eigenschaft, Wundheilungsprozesse zu fördern, wie z. B. durch ihre hämostatische Wirkung, wobei eine Thrombozytenaggregation einer raschen Blutstillung induziert wird, sind wichtige Vorteile des Kollagens [Rothamel et al. 2006].

So wie das im Säugetier in der Haut, in Knochen und in der Binde- und Stützgewebe vorkommende Kollagen den jeweiligen Strukturen eine mechanischen Stabilität verleiht, dienen kollagene Matrices zur anfänglichen Stabilisierung eines Transplantats, das dann mit fortschreitender Verweilzeit degradiert und resorbiert wird [Freed et al. 1994; Thumann et al. 2009].

Weiterhin können an dem stabilen Kollagengerüst die Zellen anhaften, ihren Phänotyp sowie ihre natürlichen Funktionen beibehalten und interzelluläre Kontakte ausbilden [Liu et al. 2007; Ju et al. 2007; Eberli et al. 2008]. Im Vergleich zwischen verschiedenen Kollagentypen zeigte sich insbesondere Kollagen Typ I als unterstützend für ein längeres Überleben der Zellen in ihrer natürlicher Form [Gigante et al. 2003].

1.2.2 Einsatz von Kollagen als Träger für Zellen

Als Träger für Zellen eignet sich besonders Kollagen Typ I, ein Biomaterial, für das in vitro vielfach eine gute Zellverträglichkeit bzw. ein Zellwachstum nachgewiesen wurde [Elsdale & Bard 1972; Schor 1980; Park et al. 2002; Glowacki & Mizuno 2008; Thumann et al. 2009].

Kollagen Typ I bildet die Hauptkomponente der inneren Kollagenschicht der Bruch'schen Membran. Es konnte gezeigt werden, dass sich die innere Kollagenschicht

zu einer erneuten Anheftung von isoliertem RPE eignet, während auf komplett isolierter Bruch'scher Membran von allogenen Spenderaugen die RPE-Zellen schlechter adhären [Ho & Del Priore 1997; Del Priore et al. 2001]. Demgegenüber wurde auf Folien aus Kollagen eine sehr gute Adhäsion retinaler Pigmentepithelzellen nachgewiesen [Thumann et al. 2006a].

In den subretinalen Raum eingebrachte Zellsuspensionen oder auch einreihige Zellschichten ohne Träger garantieren nicht die Bildung bzw. Aufrechterhaltung eines Monolayers, was zu den oben genannten, für das Überleben der Retina unabdingbaren Funktionen, notwendig wäre [Crafoord et al. 1999; Yaji et al. 2008]. Dies legt die Idee eines präformierten Transplantats mit darauf adhären den RPE-Zellen nahe, die ihre Zellformation durch die Unterstützung des Kollagengerüsts bis zur Kontaktausbildung zu den Photorezeptorzellen zunächst beibehalten, was das Erreichen einer persistierenden subretinalen Lage der Zellen als Monolayer ermöglichen würde.

Die in vitro sehr gut zur Kultivierung von retinalen Epithelzellen verwendbaren kollagenen Materialien sind ebenso als Träger für diese Zellen zur Transplantation einsetzbar [Wang H et al. 2006; Thumann et al. 2006a; Thumann et al. 2009]. Kollagen-Folien wurden bisher bei verschiedenen Zellreihen als Träger eingesetzt [Elliott et al. 2005; Koizumi et al. 2007; Wakitani et al. 2007; Amyot et al. 2008]. Bei in vitro Versuchen mit ARPE-19-Zellen konnte gezeigt werden, dass auf synthetisch hergestellten Kollagen-Folien RPE-Zellen erfolgreich kultiviert werden können, die sich morphologisch in hexagonaler Form dicht anordnen, ähnlich einem Kopfsteinpflaster, somit phänotypisch den in vivo-Charakteristika entsprechen und zur Phagozytose fähig sind [Thumann et al. 2006a; Lu et al. 2007].

1.3 Altersbedingte Makuladegeneration (AMD)

1.3.1 Ursachen und Krankheitsbild der AMD

AMD ist die häufigste Ursache von Altersblindheit in der westlichen Welt [Bressler et al. 1988; Scheider et al. 1999; Gehrs et al. 2006]. Dabei zeigen mehr als 50% der über 65 jährigen Europäer klinische Zeichen der altersbedingten Makulopathie. Es sind derzeit schätzungsweise mehr als 2,5 Millionen Menschen in Europa an AMD erkrankt [Augood et al. 2006]. Zusätzlich nimmt die Bedeutung der altersbedingten Makuladegeneration durch die steigende Anzahl der Menschen höheren Alters immer weiter zu, wobei alleine in den USA aktuell etwa 7,5 Millionen Menschen gefährdet sind, diese Erkrankung zu entwickeln [Friedman et al. 2004]. Bei einem Alter von unter 55 Jahren tritt die AMD selten auf, oberhalb dieser Grenze steigt die Wahrscheinlichkeit erheblich [Klein et al. 2010].

Etwa 10 bis 15 Prozent der Patienten erleiden schwere zentrale Sehverluste, wobei 25% von der trockenen Form und 75% von der feuchten Form der AMD betroffen sind [Elsdale & Bard 1972]. Die trockene Form ist charakterisiert durch RPE-Zellatrophie und choriokapillare Degeneration, während bei der feuchten Form choroidale Neovaskularisation (CNV) durch die Bruch'sche Membran in den subretinalen Raum mit Einblutung in die Netzhaut und dadurch bedingte RPE-Zerstörung im Vordergrund steht. In beiden Fällen führt dies zur Degeneration von darüber liegenden Photorezeptorzellen und somit zum Sehverlust [Ferris et al. 1984; Zarbin 2004].

AMD ist eine sehr komplexe Erkrankung mit demographischen, umweltbedingten und genetischen Risikofaktoren. Studien konnten belegen, dass vor allem das Alter, das mit altersbedingten Veränderungen der Netzhaut assoziiert ist, aber auch das Geschlecht, die Rasse, das Rauchen und die Ernährung eine wichtige Rolle bei der Entstehung dieser Erkrankung spielen [Coleman et al. 2008; Jager et al. 2008; Klein et al. 2010].

Zur Entstehung sowie als kennzeichnend für die AMD wird postuliert, dass das RPE degeneriert und der Abbau der abgeschnürten Photorezeptor-Außensegmente nur eingeschränkt stattfindet, was zur Akkumulation vom Material in den Zellen führt

[Bressler et al. 1994]. In den unterhalb des RPE entstehenden Ablagerungen, den sog. Drusen, finden sich verschiedene Proteine, die den Photorezeptoren, dem RPE, der Choroidea oder den im Körper zirkulierenden Serumproteinen zugeordnet werden können [Crabb et al. 2002]. Darüber hinaus verdickt sich die Bruch'sche Membran mit folgender Änderung der Zusammensetzung der Membranbestandteile und Veränderungen der Choriokapillaris, wodurch der Nährstofftransport abnimmt. Beeinträchtigte Funktionen des RPE führen zum Untergang der Photozellrezeptoren, woraus eine Verschlechterung der Sehkraft resultiert [Bressler et al. 1988; Vingerling et al. 1995; Zarbin 2004].

1.3.2 Aktuelle Therapiekonzepte der AMD

Der trockenen Form der AMD stehen derzeit bis auf wenige komplikationsbehaftete chirurgische Interventionen kaum Therapieoptionen entgegen. Nachweisbar unterstützend und präventiv waren lediglich Nahrungsergänzungsmittel wie beispielsweise Antioxidantien, Vitamine und Mineralien, wohingegen die Möglichkeiten zur Behandlung der feuchten Form der AMD in den vergangenen Jahren, insbesondere medikamentös durch die Einführung der VEGF-Inhibitoren, ausgeweitet werden konnten. Diese brachten nicht nur einen Visuserhalt, sondern in einigen Fällen auch eine Visusverbesserung mit sich [Joussen et al. 2007; Evans & Henshaw 2008; Vedula & Krzystolik 2008].

Die Laserphotokoagulation und die photodynamische Therapie wurden in verschiedenen Studien untersucht. Diese Behandlungen erfordern auch nach erfolgreicher Durchführung Nachbehandlungen, weil die CNV persistiert oder wieder auftritt. Die Argonlaserkoagulation erzeugt lokale Narbenherde, die für entsprechende Gesichtsfeldausfälle sorgen. Die Rezidivquote beträgt 50 %. Die Photodynamische Therapie mit Verteporfin ist seit 2000 in Deutschland zugelassen, ist jedoch seit dem Vorliegen der Studienergebnisse mit dem VEGF-Inhibitor Ranibizumab mit einer Visusstabilisierung in 95 % und Visusverbesserung in 30 % der untersuchten Fälle, bei der exsudativen AMD nur noch in Einzelfällen als Alternativbehandlung empfohlen.

[Macular Photocoagulation Study Group 1991, 1994; Treatment of Age-Related Macular Degeneration With Photodynamic Therapy Study Group 1999; Position of the Retinological Society, the German Ophthalmological Society and the Professional Association of Ophthalmologists in Germany on the current therapeutic possibilities for neovascular age-related macular degeneration 2007].

Der Einsatz photodynamischer Therapie als Kombinationstherapie mit intravitrealen Steroiden sowie Anti-VEGF-Antikörpern zeigte bisher eine Stabilisation des Visus und synergistische Effekte, so dass eine geringere Injektionsfrequenz dadurch erreichbar wäre, unterlag bezüglich der zu erreichenden Sehschärfe jedoch dem Erfolg der Monotherapie mit VEGF-Inhibitoren. Die Kombinationstherapien sind Gegenstand aktueller Forschung [Liggett et al. 2006; Chaudhary et al. 2007; Augustin et al. 2007].

Neben diesen Ansätzen gibt es mehrere operative Behandlungsoptionen, wie beispielsweise die alleinige Entfernung der CNV-Membran. Diese führt jedoch zu keiner Verbesserung der Sehkraft, da die lokale RPE-Schicht, die Bruch'sche Membran sowie die Choroidea dabei manipuliert und beschädigt werden. Daher wurde beispielsweise im Rahmen der CNV-Entfernung anschließend eine adulte allogene RPE-Zelllage auf Gelatine transplantiert, welche in Kombination mit Immunsuppression zu keiner Inflamations- oder Abstoßungsreaktion führte, jedoch auch keine Visusverbesserung erbrachte [Tezel et al. 2007].

Zusammen mit Choroidea transplantiertes RPE zeigte zunächst Erfolg, was aber aufgrund der sehr traumatischen Operationstechnik keine optimale Lösung darstellt. Zudem konnte hierdurch keine dauerhafte Visuserhaltung erzielt werden, da die Photorezeptorschicht über dem Transplantat nach einigen Monaten zu degenerieren beginnt [Treumer et al. 2007; MacLaren et al. 2007; Heussen et al. 2008; Peterson et al. 2008].

Die Makularotation stellt eine der erfolgreichen aktuellen Behandlungsmethoden dar. Hierbei konnte in Studien eine Verbesserung des Visus in 1/3 der AMD-Fälle gezeigt werden, was die prinzipielle Möglichkeit einer Rekonstruktion demonstriert. Jedoch kommt diese Möglichkeit der Behandlung aufgrund ihrer hohen Risikorate für postoperative Komplikationen wie beispielsweise Makulaödem, Amotio und proliferative Vitreoretinopathie sowie für Rezidive nicht bei allen Patienten in Betracht.

Zudem zeigten manche der behandelten Patienten nur eine vorübergehende Verbesserung des Visus [Aisenbrey et al. 2002; Mruthyunjaya et al. 2004; Aisenbrey et al. 2007].

Als Ursache der Neovaskularisation in der AMD wird die Dysbalance zwischen Angiogenesestimulatoren und Inhibitoren diskutiert [Folkman 1995; Pepper 1997]. Dabei scheint VEGF als Wachstumsfaktor die größte Rolle in der Entstehung der CNV-Membran zu spielen [Kwak et al. 2000; Wang F et al. 2003].

In diversen Studien wurden verschiedene Substanzen zur Modulation des VEGF-Effektes erfolgreich angewendet, wie z. B. VEGF neutralisierende Oligonukleotid-Aptamere [Gragoudas et al. 2004], Anti-VEGF-Antikörper [Presta et al. 1997], Inhibitoren der Tyrosinkinase Signalkaskade [Takeda et al. 2003] und VEGF-mRNA-Abbau induzierende siRNA (small interfering) [Tolentino et al. 2004] und shRNA (short hairpin) [Cashman et al. 2006; Paskowitz et al. 2007].

Die neuen antiangiogenen Therapien sind die derzeit erfolgreichsten Behandlungsmethoden. Mit Pegaptanib als VEGF-Inhibitor konnte eine gute Visusstabilisierung erzielt werden. Ein Durchbruch in der medikamentösen AMD-Therapie mit nicht nur Visusstabilisierung in 90 – 95 % der Fällen, sondern sogar eine signifikante Visusbesserung brachte das humanisierte monoklonale Antikörperfragment Ranibizumab. Der off-label intravitreal applizierte Wirkstoff Bevacizumab, der gegenwärtig im Rahmen verschiedener Tumorerkrankungen erfolgreich eingesetzt wird, hat bei vergleichsweise deutlich niedrigerem Kostenfaktor ähnlich gute Resultate wie Ranibizumab vorweisen können. Erfolgreich war auch der Einsatz von Bevacizumab kombiniert mit Triamcinolon bei der Behandlung von AMD mit CNV-assoziiierter großflächiger Pigmentepithelabhebung [Brown et al. 2006; Rosenfeld et al. 2006; Jonas et al. 2007; Schouten et al. 2009; el Matri et al. 2010].

Die antiangiogenen Medikamente, die sehr gute Ergebnisse brachten, sind in ihrer Wirkung zeitlich begrenzt und können zu relevanten systemischen Konzentrationen mit Gewebsveränderungen führen. Sie setzen funktionales RPE sowie eine intakte Retina voraus. Auch sind sie bei sehr großen CNV-Membranen nicht ausreichend wirksam, so dass hier als Behandlungsmethode die Makularotation zielführender ist. Eine Rekonstruktion der lokal degenerierten Zellen findet durch VEGF-Inhibitoren-

Behandlung nicht statt. Dies macht wiederholte risikobehaftete intravitreale Injektionen notwendig, was unter anderem zu intravitrealen Blutungen, Linsenschäden, Endophthalmitis, Gefäßverschlüssen oder Amotio führen können. [Mennel et al. 2007; Chan et al. 2007].

Die Suche nach minimalinvasiven, nicht inflammatorischen und kurativen Ansätzen zur Therapie der AMD ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Vorstellbar wäre ein neuer Weg, wie in dieser Arbeit vorgeschlagen.

1.3.3 AMD-Therapie durch PE-Transplantation

Der Umstand, dass Basalmembranen reichlich Kollagen I enthalten, macht Kollagen I zu einem Biomaterialkandidaten, der die Bruch'sche Membran ersetzen und gleichzeitig als Träger für Pigmentepithelzellen (PE) in der Behandlung der AMD agieren kann.

In Tiermodellen konnte nach RPE-Transplantation eine Verzögerung der Photorezeptordegeneration und Reduktion der Choroideaatrophierung beobachtet werden [Majji & de Juan 2000]. Bei Patienten im Frühstadium von AMD sollte die Transplantation von RPE-Zellen also die Funktionen der Sinneszellen zumindest aufrechterhalten. Dennoch konnten Versuche mit autologen und homologen RPE-Zellen die Sehkraft wieder herzustellen, keine zufrieden stellenden Ergebnisse liefern [Algvere et al. 1999].

An einem AMD-Patienten konnte gezeigt werden, dass die RPE-Zelltransplantate weder richtig an die Bruch'sche Membran haften, noch eine Form eines Monolayers unter der Fovea annimmt [Del Priore et al. 2001].

Auch andere Studien, in denen verschiedene Formen der Transplantation als Zellsuspension oder –Lage angewandt wurden, zeigten eine nachfolgende Stabilisierung, jedoch keine Verbesserung der Sehkraft [Aisenbrey et al. 2006a]. Benötigt wird eine Trägersubstanz, welche das RPE in seiner Lage in korrekter Polarität als Monolayer stabilisiert und dabei die für das Überleben der transplantierten Zellen notwendigen Stoffwechsel- sowie Elektrolyttransporte von den Photorezeptoren über

das RPE auf der Trägersubstanz zur Choroidea und zurück nicht relevant einschränkt [Del Priore & Tezel 1998].

Bisher wurden verschiedenste Materialien auf ihre Eignung als Trägersubstanz für RPE untersucht [Sheridan et al. 2004], wie die vordere Linsenkapsel [Hartmann et al. 1999; Kiilgaard et al. 2002; Lee et al. 2006], Amnionmembran [Ohno-Matsui et al. 2005; Singhal & Vemuganthi 2005], homologe Bruch'sche Membran [Castellarin et al. 1998], Kollagen Typ I [Bhatt et al. 1994; Thumann et al. 2006a; Lu et al. 2007; Thumann et al. 2009] und synthetische, abbaubare sowie nicht abbaubare Polymere [Giordano et al. 1997, Tezcaner et al. 2003; Williams et al. 2005].

Aufgrund der klinisch nachgewiesenen Bioverträglichkeit und Verfügbarkeit als 7µm dünne und somit für subretinale Transplantationen einsetzbare Folie, wurden für diese Arbeit Kollagenfolien aus equinem Kollagen Typ I als Trägermaterial für ARPE-19-Zellen zur subretinalen Transplantation in Kaninchenaugen verwendet.

2 ZIELSETZUNG

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist eine degenerative Netzhauterkrankung, die zur Erblindung führt. Derzeit existieren verschiedenste Behandlungsmethoden, deren Erfolg jedoch nicht zufrieden stellend ist. Zielsetzung in dieser Arbeit ist die Entwicklung eines neuen Behandlungskonzeptes für die AMD, welches sich stärker an bereits vorhandenen Strukturen im subretinalen Raum orientiert. Hierfür sollten Kollagenfolien als Träger für ARPE-19-Zellen, die subretinal in Kaninchenaugen transplantiert wurden, auf ihr Abbauverhalten und Bioverträglichkeit untersucht werden. Dabei wurden die transplantierten Augen zu verschiedenen Zeitpunkten makroskopisch und histologisch bewertet.

Das Material sollte als stabiler, strukturgebender Träger bei der Kultivierung und Transplantation dienen sowie markierbar, lagerbar und anschließend in vivo abbaubar sein. Zu erreichen galt, die mit ARPE-19-Zellen kultivierte Folie möglichst unversehrt subretinal zu transplantieren, wobei diese glatt und die Zellen retinal orientiert zwischen der Netzhaut und der Bruch'schen Membran zum Liegen kommen musste. Voraussetzung dafür war, bei optimaler Operationstechnik eine sinnvolle Größe der Transplantatstücke zu finden und die darauf gesäten Zellen bei der Operation beim Aufnehmen und Platzieren nicht zu beschädigen.

Ebenso musste die Wiederauffindbarkeit der Folie mit den Zellen in den transplantierten Kaninchenaugen gesichert werden, um die Folie eindeutig identifizieren und die das transplantierte Areal umgebende Gewebe beurteilen zu können.

Idealerweise sollte der Träger stabil bei der Transplantation sein, sich anschließend möglichst schnell abbauen und dabei keine Entzündungsreaktion hervorrufen. Die transplantierten Zellen können so den Platz und die Funktionen der zu ersetzenden Zellen übernehmen und so das Zugrundegehen des Sehvermögens bei RPE-Degeneration-bedingten Erkrankungen möglicherweise verhindern, bzw. bei bereits bestehender Schädigung der Netzhaut in diesem Stadium aufhalten.

Die oben genannten Kriterien sollten in dieser Arbeit in vivo makroskopisch und mikroskopisch aufgearbeitet und dargestellt werden, um Aufschluss darüber zu geben, ob das von uns verwendete Material sich gut dazu eignet, ein Träger für Zellen bei subretinalen Transplantationen zu sein.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Physikochemische Eigenschaften der Kollagenfolie

Für die Versuche wurde Kollagenfolie der Firma RESORBA Wundversorgung verwendet. Die Folie ist 7 µm dick und enthält 1 mg equine, native Kollagenfibrillen pro cm². Die Kollagenfolie ist sowohl in ihrer trockenen Form als auch in wässriger Flüssigkeit semitransparent (Abb. 3a). Die trocken und steril verpackten Folien quellen in wässriger Lösung (Wasser, PBS) auf etwa 10 µm Dicke.

3.1.1 DTAF-Färbung von Kollagenfolien

Die Kollagenfolien wurden mit 5-(4,6-dichlorotriazinyl)aminofluorescein (5-DTAF), einem gelben Fluoreszenzfarbstoff, gefärbt. 5-DTAF ist ein Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum von 492 nm und einem Emissionsmaximum von 516 nm. 5-DTAF modifiziert Aminogruppen in Proteinen, Polysaccharide und Alkohole in wässriger Lösung bei einem pH > 9 [Blakeslee & Baines 1976].

Für die Färbung der Kollagenfolien wird eine Farbstofflösung aus DTAF und Natriumbikarbonat im Verhältnis von 1 : 1 hergestellt. Die Folien werden in dieser Färbelösung für eine Minute bei RT inkubiert. Anschließend werden diese 3-fach in sterilem PBS gewaschen. Die gefärbten Folien werden in sterilem PBS bis zur Implantation bei 4 °C aufbewahrt.

3.2 Besiedlung von Kollagenfolien mit RPE für die Transplantation

3.2.1 ARPE19 Kultur

Die ARPE19-Zelllinie ist eine humane Zelllinie von retinalen Pigmentepithelzellen. Die ARPE19-Zellen wachsen in Kulturgefäßen unter optimalen Bedingungen zu einem konfluenten Zellmonolayer. Die Zellen wurden in MEM-Kulturmedium bei 37 °C unter CO₂-Begasung kultiviert.

Das Kulturmedium wurde alle 2 - 3 Tage erneuert und die Kulturen wöchentlich bei Erreichen der Konfluenz auf neue Kulturgefäße mit Hilfe der Trypsinierung passagiert. Trypsin spaltet bestimmte Peptidbindungen von Proteinen und sorgt so für die Ablösung der Zellen vom Untergrund und von benachbarten Zellen.

3.2.2 Besiedlung von Kollagenfolie mit ARPE19-Zellen

Die zu besiedelnde Kollagenfolie wurde in einem unbeschichteten zur Zellkultur geeigneten Schale flach aufgelegt und mit einem Glasring beschwert, damit diese sich nicht vom Boden ablöste und nur mit der nach oben liegenden Seite mit den Zellen in Kontakt kam. Anschließend werden die durch Trypsinierung passagierten Zellen zusammen mit 2 ml Medium auf die Kollagenfolie gegeben.

Nach 48 stündiger Inkubation bei 37 °C wurde die zellenbesetzte Folie in steriles PBS überführt und weiterverarbeitet.

3.2.3 Vorbereitung der Kollagenfolie für die Implantation

Mit einer Pinzette wurde die Folie auf ein steriles Stück Papier gezogen, wobei diese nur vorsichtig an den Ecken gehalten wurde. Sie legte sich dabei der Unterlage glatt an und konnte dann, durch die dadurch erreichte Stabilität, präzise in die erforderlichen ca. 1 mm x 1,5 mm großen Stücke zugeschnitten werden.

Die Kollagenfolie wurde auf dem Papier liegend unmittelbar vor der Transplantation zugeschnitten um eine Zuordnung der zellbesiedelten Seite gewährleisten zu können. So konnten aus dem mittleren Bereich zellenbesetzte unbeschädigte Transplantate ausgeschnitten und diese dann mit einer Mikropinzette oder einem Injektor direkt vom Papier gelöst aufgenommen und transplantiert werden.

3.3 Versuchstiere

Für den Versuch wurden weibliche Kaninchen der Rasse Chinchilla Bastard verwendet. Das Regierungspräsidium in Köln genehmigte das Tierexperiment laut § 8 TSchG unter dem Aktenzeichen (50.203.2 – AC 3, 17/06). Die Chinchilla-Bastard-Kaninchen wurden von Charles River Laboratories aus der Niederlassung Kisslegg mit einem Gewicht von 2,5 – 3,0 kg bezogen und ca. 10 Tage vor Versuchsbeginn in die Einrichtungen des Institutes für Versuchstierkunde des Universitätsklinikum Aachen gebracht. Somit konnten sich die Tiere erst an den Menschen und ihre neue Umgebung gewöhnen.

3.3.1 Tierhaltung

Die Haltung erfolgte bei einer konstanten Raumtemperatur von 22 ± 2 °C, 50 - 55 % Luftfeuchtigkeit, einem Luftwechsel von 15-mal pro Stunde und einem Tag-/Nachttrhythmus von 12 Stunden, was den konventionellen Bedingungen entspricht.

Während der Dauer der Haltung lebten die Tiere in den meisten Fällen in Bodenhaltung auf Holzhebelspänen (Fa. Lennardz, Heinsberg), wobei die Gruppengröße in Räumen von 12,19 m² und 14,19 m² 10 Kaninchen nicht überstieg. Diese Haltungsart des Kaninchens in der Gruppe entspricht am ehesten seinen Grundvoraussetzungen [Harkness 1987]. Als Rückzugs- und erhöhte Liegemöglichkeit dienten umgedrehte Meerschweinchen-Haltungswannen. Einmal pro Woche erfolgte die Reinigung der Räume mit Wechsel der Einstreu.

In Einzelfällen, bei Lieferung von wenigen Tieren oder bei längerer Versuchsdauer einzelner Tiere, wurden die Kaninchen einzeln in Edelstahlkäfigen mit Lochblech-Böden gehalten (pro Tier 1 Doppel-Kaninchen-Zucht- und Haltungskäfig Nr. KK 017, Fa. Ehret). Diese Käfige, umlaufend mit Edelstahlgitter um 20 cm erhöht, enthielten ebenfalls eine Liegefläche von 35 x 18 cm in 20 cm Höhe an der hinteren Wand, welche gleichzeitig einen Unterschlupf bietet.

Durch postoperative Kennzeichnung mit einer Ohrnummer per Tätowierung konnten die einzelnen Kaninchen eindeutig identifiziert werden. Diese Nummern wurden zusätzlich auf eine für Versuchstiere konzipierte Karte notiert, die vor den Räumen, bzw. Käfigen hingen. Hierauf waren Einzelheiten über die Tiere, den Tierversuch und laufend bei Veränderungen bzw. Operationen ergänzte Daten einsehbar. Diese Karten wurden nach Versuchsende zur Überprüfung durch Tierschutzbeauftragte abgegeben.

Für die Tiere standen Nahrung und Wasser ad libitum zur Verfügung. Sie wurden mit Kaninchenhaltungsfutter (Nr. 2333, 4 mm, Fa. Ssniff) sowie Heubriketts (Fa. Ssniff) in der Käfighaltung bzw. Heu in der Bodenhaltung gefüttert. Wasseraufnahme erfolgte mittels Nippeltränken an den Käfigen bzw. an einer großen Schale auf dem Boden in der Gruppenhaltung, die täglich mit frischem Leitungswasser gefüllt wurden. Durch diese ad libitum-Fütterung konnten die natürlichen Bedingungen des Kaninchens nahezu erreicht werden [Lehmann 1990].

Die tägliche Kontrolle und Beobachtung der Tiere erfolgte durch die Tierpfleger, die postoperative Nachsorge durch die an dem Experiment beteiligte Doktorandin.

3.4 Operation und Narkoseverfahren

3.4.1 Narkoseverfahren

Die Betäubung der Kaninchen erfolgte in Allgemeinanästhesie unter Beibehaltung der Spontanatmung. Dazu wurden die Tiere gewogen und eine halbe Stunde vor Operationsbeginn in Einzeltiertransportboxen in die tierexperimentelle Abteilung des Universitätsklinikums Aachen transportiert.

Die Narkose wurde durch intramuskuläre Injektion von Ketaminhydrochlorid (Ketamin® 10 %), 20,0 mg/kg Körpergewicht und Xylazinhydrochlorid (Xylazin 2 %), 3,0 mg / kg Körpergewicht eingeleitet und im weiteren Verlauf durch viertelstündliche repetitive Gabe der halben Dosierung aufrechterhalten.

Auf eine Intubation oder Katheterisierung der Tiere konnte verzichtet werden.

3.4.2 Operativer Eingriff

Um für die subretinale Transplantation eine optimale Fundussicht zu haben, wurde Phenylephrin 0,25 g / Tropicamid 0,5 g (MS-Augentropfen), zur Oberflächenanästhesie des Operationsgebietes Oxybuprocaine (Novesine® 0,4 %) und zum Schutz vor Austrocknung Hypromellose (Methocel® 2 %) auf die Augen gegeben.

Vor der Operation wurde das Tier zur eindeutigen postoperativen Identifizierung an beiden Ohren mit einer dreistelligen Nummer tätowiert. Anhand der Lid- und Lichtreflexe war die notwendige Narkosetiefe zu prüfen. Es wurde pro Tier nur in ein Auge eine Kollagenfolie subretinal transplantiert.

Zuerst wurden Traktionsnähte aus Handseide 3/0 oder Mersilene 3/0 in die geraden Augenmuskeln eingenäht, um das dann protrudierte Auge fixieren zu können. Im Bereich von 11 Uhr wurde parallel zum Limbus die Bindehaut eröffnet und in diesem Bereich eine Sklerotomie angelegt. Über eine Infusionskanüle (Infusion von NaCl 0,9 % 500 ml mit Heparin 25000 I.E. (Liquemin®)- und Dexamethasonzusatz 2 mg (Fortecortin®)), die über diese Sklerotomie in den Augapfel eingeführt und mit Vicrylnähten (Vicryl® 7/0) dort fixiert wurde, konnte der Augeninnendruck aufrechterhalten werden. Anschließend erfolgte nach erneuter Inzision der Konjunktiva die Sklerotomie zur pars plana Vitrektomie in der 4 Uhr-Position.

Zur Sicht auf den Fundus wurde eine direkte Funduskopierlupe (Kilp-Linse) auf das mit Methocel befeuchtete Auge aufgelegt. Über die zweite Sklerotomie wurden die Operationsinstrumente eingeführt. Nun erfolgte die partielle Vitrektomie über der zu transplantierenden Stelle der Netzhaut.

Es wurde standardisiert nasal der Papille unterhalb der myelinisierten Nervenfasern subretinal transplantiert. Mit einer dünnen atraumatischen Kanüle wurde zunächst durch Unterspritzung von 0,9 % NaCl eine Netzhautablösung herbeigeführt, was an dieser Stelle zur Bildung einer Blase führt (Abb. 3a). Dies erleichterte die darauf folgende Retinotomie (Abb. 3b). Dann konnte die Folie mit einer Mikropinzette unter die Retina platziert werden (Abb. 3c). Zur Anlagerung der Netzhaut wurde, wenn nötig, 100 % fluoriertes Perfluordecalin (F-Decalin) verwendet.

Die sklerotomierten Stellen wurden mit Vicrylnähten (Vicryl® 7/0) verschlossen und die Traktionsnähte entfernt.

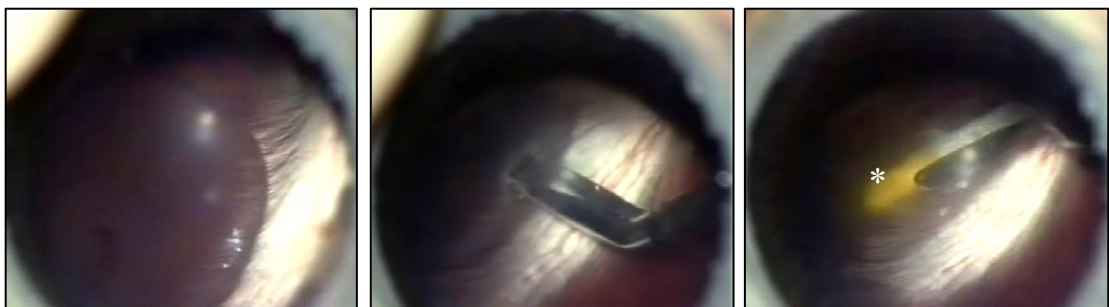


Abb. 3a: Durch Unterspritzung der Netzhaut mit 0,9 % NaCl konnte eine Blase gebildet werden.

Abb. 3b: Erleichterte Retinotomie an der mit NaCl-Unterspritzung gebildeten Blase.

Abb. 3c: Die DTAF-gefärbte Kollagenfolie (*) wird mit einer Mikropinzette unter die Netzhaut platziert.

3.4.3 Postoperative Behandlung und Verlaufskontrolle

Postoperativ wurden prophylaktisch antibiotische Augentropfen (Tobramycin 3 mg (Tobramaxin®) oder Dexamthason 1 mg, Neomycin 3500 I.E., Polymyxin-B-sulfat 600 I.E. (Isoptomax®)) und analgetische Augentropfen (Oxybuprocaine (Novesine® 0,4 %)) verabreicht.

Die Aufwachphase verbrachten die Kaninchen unter Beobachtung in Einzelboxen in einem ruhigen Raum, wonach sie wieder zurück in den Tierstall kamen.

Die Tiere wurden anfangs täglich, anschließend alle drei Tage von der zuständigen Doktorandin kontrolliert. Im Verlauf waren die Wunden reizlos und es zeigten sich keine Verhaltensänderungen, ebenso war die Nahrungsaufnahme und Kotabsetzung unverändert, so dass auf weitere Gabe von Medikamenten verzichtet werden konnte.

3.5 Makroskopische Aufarbeitung der Augen

3.5.1 Enukektion und Fixierung

Die Tiere wurden zum jeweiligen Enukektionszeitpunkt durch intravenöse Gabe einer Überdosis Pentobarbital-Natrium 160 mg/kgKG (Narkoren®) von einer Tierärztin des Institutes für Versuchstierkunde euthanasiert. Sowohl das transplantierte, als auch das nicht-transplantierte Auge wurden mit Hilfe einer Pinzette und eines Skalpells enukleiert.

Nach lateraler Kanthotomie (Lidschnitt des Ligamentum palpebrale laterale) und Durchtrennung der Bindehaut, der Muskeln sowie des Sehnervs konnte der Augapfel unversehrt entnommen werden. Die Augen wurden in 4 % Paraformaldehyd für 3 Tage bei 8 °C fixiert. Anschließend folgte der Austausch der Fixierungsflüssigkeit durch PBS, wobei die Augen entweder sofort verarbeitet oder weiterhin bei 8 °C gelagert werden können.

3.5.2 Makroskopischer Zuschnitt

Die fixierten Augen wurden mit einem Skalpell aufgeschnitten. Zunächst wurde ein Ringschnitt um die Iris durchgeführt und die Kornea, die Linse und der Glaskörper entfernt. Anschließend wurde das Auge von distal der Papille bis zum transplantierten Areal zugeschnitten.

Da die Folie standardisiert ca. 0,3 cm nasal der Papille unterhalb der myelinisierten Nervenfasern subretinal transplantiert wurde, war diese in dem so abzugrenzenden Bereich, zusätzlich aufgrund der Gelbfärbung durch DTAF, unter dem Makroskop gut zu identifizieren. Dieser Bereich wurde mit einem Sicherheitsabstand von etwa 0,3 cm herausgeschnitten und in Einbettkassetten gelegt, die bis zur Entwässerung mit anschließender Paraffineinbettung in Leitungswasser gelagert wurden.

Die Augen wurden nach dem Eröffnen und in den einzelnen Schritten des Zuschnittes zur Dokumentation photographiert.

3.6 Histologische Aufarbeitung der Augen

3.6.1 Einbettung in Paraffin

Die makroskopisch zugeschnittenen Gewebestücke in den Einbettkassetten wurden mit Hilfe des Einbettautomaten der Firma Sakura über Nacht zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (je 1 h in 2x 70 %, 2x 96 %, 3x 100 % Ethanol). Das Entfernen des Alkohols erfolgt nun durch Einbringen der Einbettkassette in Xylol (je 1 h in 3x 100 % Xylol). In den letzten Stufen wurden die Präparate mit Paraffin durchtränkt (je 1 h in 60 °C Paraffin).

Es folgt die Einbettung des Gewebes in paraffingefüllte Eingießförmchen an der Ausgießstation entsprechend der gewünschten Schnittrichtung. Die dann auf einer Kühlplatte erstarrten Paraffinblöcke konnten vom Eingießförmchen gelöst in Dünnschnitttechnik mittels Schlittenbahnmikrotom bearbeitet werden.

3.6.2 Herstellung von Schnittpräparaten mittels Dünnschnitttechnik

Aus den in Paraffin eingebetteten Präparaten wurden mit Hilfe eines Schlittenbahnmikrotoms 3 - 4 µm dicke Schnitte angefertigt, welche auf Superfrostobjektträger aufgezogen wurden. Vor der Färbeprozedur trockneten die Präparate in einem Wärmeschrank bei 37°C über Nacht oder bei Raumtemperatur 48 h.

3.6.3 HE-Färbung von Schnittpräparaten

Zur Entfernung des Paraffins wurden die Objektträger für je 10 min 3x in 100% Xylol, anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe für je 10 min 2x in 100 % Ethanol, 1x in 96 % Ethanol und 1x in 70 % Ethanol inkubiert. Zuletzt wurden diese 3x in Aqua dest gewaschen, was zur Entfernung des Ethanols aus dem Gewebe diente.

Die HE-Färbung der Schnittpräparate stellt alle basophilen Gewebsstrukturen (z. B. das Chromatin der Zellkerne) blau und alle azidophilen Bestandteile (z. B. Zytoplasma, einige Interzellulärsubstanzen) in verschiedenen Abstufungen rot dar.

Die entparaffinierten Schnitte wurden zunächst in Mayer's Hämalaun für 10 min eingestellt und dann in Aqua dest kurz gespült. Es folgte 10 min das Bläuen unter fließend warmes Wasser. Anschließend wurden die Schnitte in Eosin, 0,1 % in Aqua dest, 10 Minuten gefärbt, wobei es mäßig überfärbt werden sollte. Nach Auswaschen in Aqua dest folgte eine aufsteigende Alkoholreihe in Ethanol (5 min in 70 % Ethanol, 3x kurz eintauchen in je 1x 96 %, 2x 100 % Ethanol) mit anschließender Tränkung für je 5 min in 3x 100 % Xylol.

Mit einem Einbettungsmedium auf Xylolbasis (Vitro-Clud®) wurden die Schnittpräparate sofort nach dem letzten Einbringen in Xylol mit einem Deckgläschen eingedeckt. Nach dem Trocknen des Einbettungsmediums sind die Schnitte bei Raumtemperatur unbegrenzt haltbar. Die HE-Färbung der Augenpräparate ermöglicht eine morphologische Beurteilung per Lichtmikroskopie.

3.6.4 Mikroskopie

Die jeweiligen schnittpräparatetragenden Objektträger (native) wurden unter Licht- und Fluoreszenzmikroskopie betrachtet und photographiert. Die Fluoreszenzaufnahmen mussten vor der Hämatoxylin-Eosin-Färbung erfolgen, da der DTAF-Farbstoff anschließend keine Fluoreszenz mehr zeigte.

Die mikroskopische Auswertung der HE-gefärbten Objektträger erfolgte mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops der Firma Leica. Mit dem verwendeten Okular mit 10-facher Vergrößerung einschließlich der variierbaren Objektive war eine Betrachtung der Schnitte in 25-facher, 50-facher, 100-facher, 200-facher und 400-facher Vergrößerung möglich.

Ebenso war eine Fluoreszenzmikroskopie mit Verwendung verschiedener Filter möglich. Die Schnittbilder wurden über eine an das Mikroskop angeschlossene Hitachi-Kamera mit Hilfe einer speziellen Bildverarbeitungssoftware (Diskus) photographisch dokumentiert.

So konnten im Zusammenhang mit der transplantierte Kollagenfolie die Folie selbst, die darauf ausgesäten Zellen, der Erhalt des retinalen Schichtaufbaus des transplantierten Areals, der Dicke der einzelnen Schichten und die Anzahl der Zellkerne einen Hinweis über den Erfolg der Operation geben.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop und unter Verwendung des B1 Filters (blau, BP 455 - 490) konnten die gelb-grün-fluoreszierenden Bereiche im Gewebe identifiziert werden, sowie die DTAF-gefärbte Kollagenfolie, deren Emissionsspektrum zwischen 480 – 620 nm liegt. Hierzu waren die nativen, nicht entparaffinierten Schnitte von Bedeutung, da der dabei fluoreszierende DTAF-Farbstoff nach einer HE-Färbung nicht mehr fluoresziert.

Die Aufnahmen, in denen die Folie identifiziert wurde, konnten dann mit den korrespondierenden HE-gefärbten Schnitten verglichen und so die transplantierten Areale sicher zur Beurteilung detektiert werden.

3.7 Materialien und Geräte

3.7.1 Untersuchungsmaterial

Bezeichnung	Bemerkung	Bezugsquelle
Kollagen- resorb Folie	1 cm ² enthält 1 mg equine, native Kollagenfibrillen	RESORBA, Nürnberg
DTAF	5-(4,6-dichlorotriazinyl)aminofluorescein, Fluoreszenzfarbstoff	MOLECULAR PROBES, Karlsruhe
DTAF-Farbstofflösung	0,5 % DTAF in NaHCO ₃	Eigene Herstellung

3.7.2 Zellkultur

Bezeichnung	Bemerkung	Bezugsquelle
ARPE19	Humane Zelllinie von retinalen Pigmentepithelzellen	LCG PROMOCHEM, Wesel
NCS	Newborn Calf Serum, von bis zu 7 Tage alten Kälbern, Mycoplasmen- und Virenfrei	GIBCO BRL, Paisley, Schottland
MEM-Kulturmedium	2,8 mM L-Glutamin, 10 % NCS, 673 U/ml Penicillin, 673 µg/ml Streptomycin	Eigene Herstellung
Trypsin SL	2,5 %-ige Lösung (v/v), aus Rinderpankreas: 0,5 g Trypsin + 20 ml Lösung A (pro l: 0,4 g/l KCL; 2,2 g NaHCO ₃ ; 6,8 g NaCl; 1,0 g Glucose; 5 mg Phenolrot)	GIBCO BRL, Paisley, Schottland
Penicillin-Streptomycin-Lösung	10.000 U Penicillin/ml, 10.000 µg Streptomycin/ml 0,9 NaCl, steril (γ-Strahlung), in Zellkultur getestet	SIGMA, Deisenhofen
PBS	150 mMol NaCl, 5 mMol KCl, 8 mMol Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O in Aqua bidest, pH 7,4	Eigene Herstellung
KCL	Zur Analyse, min. 99,5 % Gehalt, M=74,56 g/mol	MERCK, Darmstadt
Na₂HPO₄ * 2H₂O	Die-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat, zur Analyse, min. 99,5 %, M=177,99 g/mol	MERCK, Darmstadt
Mediumflaschen für dynamische Kultur	500 ml, Glas, autoklavierbar	MERCK, Darmstadt
Mehrzweckbecher	100 ml mit Schraubverschluss, steril	SARSTEDT, Nümbrecht
Culture-Slide	2-Kammersysteme zur Kultivierung von Zellen	BD FALCON, Heidelberg

3.7.3 Operation und Narkose

Bezeichnung	Bemerkung	Bezugsquelle
Ketamin	Ketaminhydrochlorid 10 %, Hypnotikum und Analgetikum	CEVA TIERGESUNDHEIT, Düsseldorf
Xylazin	Xylazinhydrochlorid 2 % Muskelrelaxans, Sedativum und Analgetikum (alpha-2 Rezeptoragonist)	MEDISTAR, Holzwickede
Methocel®	Hypromellose 2%, Schutz vor Austrocknung und Kontaktflüssigkeit für die Augenoberfläche	NOVARTIS, Nürnberg
Novesine®	Oxybuprocainhydrochlorid 0,4 %, Lokalanästhetikum	VISION, Großostheim
MS-Augentropfen	Phenylephrin 2,5 %, Tropicamid 0,5 %, Mydriatikum	FAGRON GMBH, Barsbüttel
F-Decalin	100 % fluoriertes Perfluorodecalin, zur intraoperativen Wiederanlagerung der Netzhaut	GEUDER, Heidelberg
Tobramaxin®	Tobramycin, Antibiotische Augentropfen mit 3 mg/ml	ALCON, Freiburg
Isopto-Max® Augentropfensuspension	Antibiotische Augentropfen mit 1 mg/ml Dexamethason, 5 mg/ml Neomycinsulfat und 6000 I.E./ml Polymyxin-B-Sulfat	ALCON, Freiburg
Fortecortin®	Fortecortin inject 4 mg, Dexamethason, antiphlogistische Wirkung	MERCK, Darmstadt
Liquemin®	Liquemin N 25.000, Heparin Natrium 25.000 I.E., Thromboseprophylaxe	HOFFMANN-LA ROCHE, Grenzach- Wyhlen
Isotonische NaCl-Lösung	Infusionslösung, 0,9 % NaCl	DELTA SELECT, Dreieich
Tätowiersalbe	Ohrtätowierung	HAUPTNER & HERBERHOLZ, Solingen
Narkoren®	Pentobarbital-Natrium 160 mg/kg KG, Überdosis zum Einschläfern	MERIAL, Hallbergmoos
Präzisionsinstrumente	Mikropinzette gerade, -pinzette gebogen, -schere, zum Transplantieren der Folie	DORC DEUTSCHLAND, Berlin
Scharfe Kanüle	sterilisierbar, 36 gauge, zur Bildung einer subretinalen Blase	GEUDER, Heidelberg
Operationsbesteck	Nadelhalter, Faden-, Kolibri-, anatomische und spitze Pinzetten, Klemmen, Feder-, Vannas- und kleine Schere, Lidspanner, sterilisierbar	GEUDER, Heidelberg

Bezeichnung	Bemerkung	Bezugsquelle
Spritzen	BD Discardit II, Einmalspritzen, 10 ml, 2 ml	BECKTON DICKINSON, Fraga, Spanien
Kanülen	BD Microlance 3, Einmalkanülen, Nr. 1 (20 gauge), Nr. 20 (27 gauge)	BECKTON DICKINSON, Drogheda, Irland
Heidelberger Verlängerung	140 cm, zur Verlängerung der Infusions- und Transfusionsleitungen	B. BRAUN MELSUNGEN AG, Melsungen
Klip-Linse	Direkte Funduskopierlupe, verbesserte Tiefenschärfe bei Operation	GEUDER, Heidelberg
Vitrektomie-Schlauchsystem	Distal-Port Guillotine Cutters, 20 gauge	FRITZ RUCK, Eschweiler
Foliodrape	Steriles Lochtuch	HARTMANN AG, Heidenheim
Opsite-Augenpflaster	Steriles Augenpflaster	SMITH & NEPHEW, Hull, England
Mersilene 3/0	Traktionsnähte zur Protrusio bulbi	ETHICON, JOHNSON & JOHNSON, Lenneke Marelaan, Belgien
Coated Vicryl 7/0	Sklerotomieverschlussnaht, resorbierbar	ETHICON, JOHNSON & JOHNSON, Lenneke Marelaan, Belgien

3.7.4 Makroskopische Aufarbeitung der Augen

Bezeichnung	Bemerkung	Bezugsquelle
Formalin	Para-Formaldehyd-Lösung (3,7 %), neutral gepuffert, zur Fixierung von Zellen und Geweben	Apotheke der RWTH-Aachen
Skalpell Nr. 11	Einmalskalpell, schräge Klinge	PFM, Köln
Skalpell Nr. 12	Einmalskalpelle, gebogene Klinge	PFM, Köln
Einbettkassette	Tissue-TEC-Kapsel zur Paraffineinbettung, weiß	THERMO SHAN-DON, Pittsburgh
Ausgießförmchen	aus Edelstahl für die Paraffineinbettung, 24 x 24 x 5 mm	VOGEL, Gießen

3.7.5 Histologische Aufarbeitung der Augen

Bezeichnung	Bemerkung	Bezugsquelle
Objektträger	Glas, geschnitten, Mattrand, 76 x 26 mm	LANGENBRINCK, Teningen
Objektträger Superfrost	Glas, weißer Rand, 76 x 26 mm	ROTH, Karlsruhe
Poly-L-Lysin	0,1 % in H ₂ O (w/v) + 0,01 % Thiomerosal	SIGMA, München Sigma
Ethanol	100 % Ethanol	Apotheke der RWTH-Aachen
Xylol	Dimethylbenzol, C ₃ H ₁₀ , 99,8 %, MW=106,17 g/mol	Apotheke der RWTH-Aachen
Mayer's Hämalun	morphologische Färbung fixierter Zellen	MERCK, Darmstadt
Eosin G	0,1 % in Aqua bidest.	MERCK, Darmstadt
Aqua bidest	Bidestilliertes Wasser	Eigene Destillation
Pasteurpipette	10 ml Einweg-Plastikpipette	BRAND, Wertheim
Vitro-Clud®	Eindeckelmedium auf Xylolbasis	R. LANGENBRINK, Emmedingen
Deckgläser	mikroskopische Deckgläser, Borosilikatglas, 24 x 32 mm	ENGELBRECHT, Edermünde

3.7.6 Software

Bezeichnung	Bemerkung	Bezugsquelle
Diskus	Bildverarbeitungssoftware zur mikroskopischen Dokumentation am Auflichtmikroskop	TECHNISCHES BÜRO HILGERS, Königswinter
Gimp	Bildverarbeitungssoftware, Version 2.4.2	THE GIMP, www.gimp.org
Microsoft Office XP	Büroanwendungssuite	MICROSOFT DEUTSCHLAND, Unterschleißheim

3.7.7 Geräte

Bezeichnung	Bemerkung	Bezugsquelle
Mikroskop Zeiss OPMI 6-CFR XY 173336	Operationsmikroskop	CARL ZEISS AG, Jena
OMNI-Gerät	Steuerungseinheit zur Vitrektomie	FRITZ RUCK, Eschweiler
Intrafix Air-matic	Druckinfusionsgerät	B. BRAUN MELSUNGEN AG, Melsungen
Makroskop	Makroskop Leica Z16 APO	LEICA, Bensheim
Einbettautomat	Zur Entwässerung und Einbettung, Typ Tissue Tek VIP	SAKURA FINETEK EUROPE, Zoeterwoude, Niederlande
Ausgießstation	Zur Paraffineinbettung, Typ EG 1160	THERMO ELEKTRON, Dreieich
Schlittenbahnmikrotom	Zur Anfertigung von histologischen Schnitten, Typ 32045	JUNG, Heidelberg
Paraffinstreckbad	Typ TFB 45, Temperaturbereich: +30 - +90 °C	MEDITE, Burgdorf
Mikroskop	Durchlichtmikroskop Leica DM IRB	LEICA, Bensheim
Fluoreszenzlampe	Typ ebq 100 Isolated - L	LEJ LEISTUNGS- ELEKTRONIK, Jena
Kamera	Typ HVC 20A	HITACHI, Tokio, Japan
Wärmeschränk	Mit Frischluftzufuhr, Typ ULE 400	MEMMERT, Schwabach

4 ERGEBNISSE

In dieser Arbeit wurden mit ARPE-19-Zellen besiedelte Kollagenfolien subretinal transplantiert. Die Ergebnisse der Versuchsreihe werden im Folgenden für die jeweiligen Untersuchungszeitpunkte in Makroskopie und Mikroskopie dargestellt. Die Versuchsreihe schloss insgesamt 12 Tiere mit je einem operierten Auge ein: 2 Kurzzeitverläufe (3 Tage), 5 Tiere mit Verlauf bis 2 Wochen (6 – 14 Tage) sowie 5 Langzeitverläufe (21 – 35 Tage).

Die DTAF-Färbung ermöglicht eine sichere Detektion der Folie während der Transplantation (Abb. 4c) und nach histologischer Aufarbeitung (Abb. 4d, e). Die in seiner nativen Form semitransparente, farblose Kollagenfolie (Abb. 4a) erscheint nach der Färbung mit DTAF unter Tageslicht und unter dem Durchlichtmikroskop gelb (Abb. 4b, c, d) und zeigt im Fluoreszenzmikroskop bei 488 nm eine intensiv gelbe Fluoreszenz (Abb. 4e).



Abb. 4a: Ungefärbte Kollagenfolie. Die Folie ist in ihrer Nativform semitransparent.

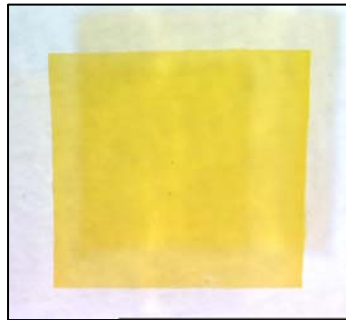


Abb. 4b: DTAF-gefärbte Kollagenfolie. Die Färbung erscheint unter Tageslicht gelb.

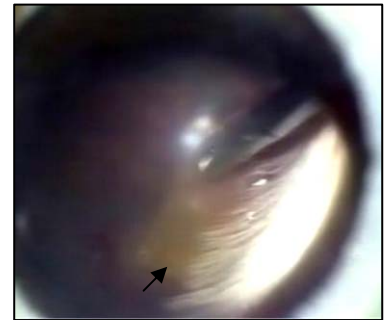


Abb. 4c: DTAF-gefärbte Kollagenfolie (Pfeil) intraoperativ. Durch die DTAF-Färbung ist die Folie intraoperativ gut darstellbar.

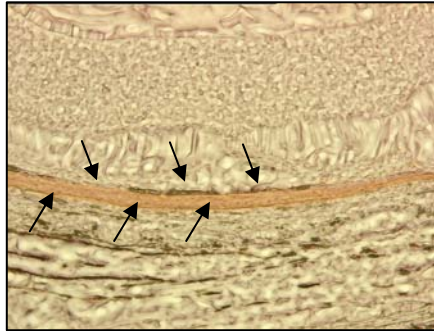


Abb. 4d: Durchlichtmikroskopie
DTAF-gefärbte, transplantierte Kollagenfolie im ungefärbten histologischen Schnitt. Die Folie ist im Durchlicht gut erkennbar (Pfeile).

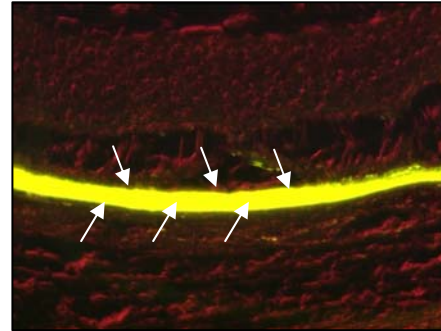


Abb. 4e: Fluoreszenzmikroskopie
DTAF-gefärbte, transplantierte Kollagenfolie (Pfeile) im ungefärbten histologischen Schnitt unter Fluoreszenzlicht. Die Folie lässt sich unter Fluoreszenzlicht durch das gelbe Leuchten eindeutig identifizieren.

Makroskopisch wurden die Transplantate im operierten Areal und die Augeninnenfläche im Gesamten beurteilt. Die Mikroskopie ermöglicht eine Aussage sowohl über die transplantierte Kollagenfolie in ihrer genauen Lage mit den Veränderungen der strukturellen Beschaffenheit und das Verhalten der Zellen im Verlauf sowie die histomorphologischen Veränderungen des angrenzenden Gewebes.

Die erste Aufnahme zeigt als Kontrollgewebe einen nicht-transplantierten Augenabschnitt zur Übersicht der zu beurteilenden Strukturen nach der Transplantation. In dem hier dargestellten histologischen Augenabschnitt lassen sich die einzelnen Netzhautschichten klar gegeneinander abgrenzen. Einschichtig der Choroidea aufliegend ist das RPE zu sehen, wobei die Verbindungen zu den äußeren Photorezeptoraußensegmenten nicht mehr besteht, da sich die Netzhaut präparationsbedingt abgelöst darstellt (Abb. 5).

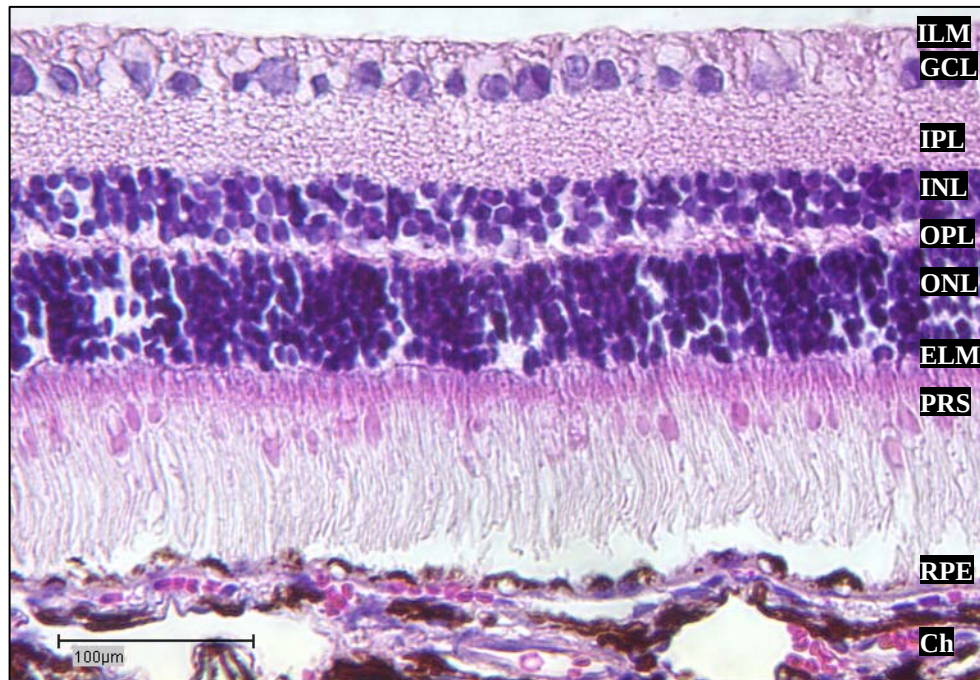


Abb. 5: HE-Färbung eines nicht-transplantierten Abschnittes im Kaninchenauge. 400x. Der Retinale Schichtaufbau ist gut erkennbar, und die einzelnen Netzhautschichten sind klar gegeneinander abgrenzbar. Das retinale Pigmentepithel (RPE) ist einschichtig über der Choroidea (Ch) zu sehen.

Innere limitierende Membran (ILM), Ganglienzellschicht (GCL), innere plexiforme Schicht (IPL), innere Körnerzellschicht (INL), äußere plexiforme Schicht (OPL), äußere Körnerzellschicht (ONL), äußere limitierende Membran (ELM), Photorezeptorsegmente (PRS), retinales Pigmentepithel (RPE), Choroidea. Die Netzhautabhebung ist durch Fixations- und Färbungsvorgänge bedingt.

4.1 Makroskopie der subretinal transplantierten Kollagenfolie mit ARPE-19-Zellen

Die makroskopischen Aufnahmen zeigen im Überblick ein befriedigendes Ergebnis der Transplantationen, erkennbar an der regelrechten, reizlosen Gesamtmorphologie, die der eines gesunden Kaninchenauges entspricht. Es ergaben sich keine Hinweise auf größere Traumata oder Inflammationsherde. In einem der Augen war nach einer Woche Beobachtungszeit im Bereich der Papille eine leichte Einblutung, zu beobachten (Abb. 8a, b), die möglicherweise während der Enukleation entstanden ist. Die Fixation nach Enukleation und die anschließende Vitrektomie nach dem Eröffnen des Bulbus führten

in einigen Arealen zu einer Abhebung der Retina (Abb. 8a, b). Beim makroskopischen Zuschnitt kam es durch das Greifen mit der anatomischen Pinzette sowie während Schneidens mit dem Skalpell stellenweise zu Netzhautabhebungen und –einrissen (Abb. 10b, Abb. 12b). Die Operationsstelle hinterlässt ein im Verlauf progredient depigmentiertes Areal, exemplarisch nachweisbar in Abb. 10b und Abb. 14b. Dies ist durch die Manipulation während des Platzierens der Folie im subretinalen Raum zu erklären, wodurch Beschädigungen des lokalen Kaninchen-RPEs entstanden. Die ARPE-19-Zellen selbst sind nicht pigmentiert, so dass anhand der Depigmentierung keine Aussage über die dortige Zellbesiedelung zu den jeweiligen Zeitpunkten gemacht werden kann.

Zu allen Untersuchungszeitpunkten liegt die Netzhaut beim Einblick in den Augapfel ubiquitär glatt dem RPE an (Abb. 6a, 8a, 10a, 12a, 14a). Es waren weder Glaskörpereinblutungen noch Glaskörpertrübungen zu beobachten. Anhand der unter Tageslicht gelb erscheinende DTAF-Färbung ist das Transplantat in den kurzen und mittleren Verläufen gut detektierbar (Abb. 6b, 8b, 10b). Hierbei ist die Folie bei vergrößerter Ansicht glatt in ihrer rechteckigen Form deutlich durch die semitransparente Retina sichtbar (Abb. 10b). In den Langzeitverläufen gab aus makroskopischer Sicht lediglich die lokal begrenzte, kleinfleckige Depigmentierung einen Hinweis auf die durchgeführte Transplantation (Abb. 14a, b)

Bereits nach einer Beobachtungszeit von drei Tagen (Abb. 6a, b) stellt sich die Netzhaut insgesamt und insbesondere am Transplantationsgebiet unter makroskopischer Sicht ohne pathologischen Auffälligkeiten der zuvor durchgeführten Operation dar. Die gelbliche Färbung an dieser Stelle weist auf die hier transplantierte zellenbesetzte Kollagenfolie hin. Es sind weder Einblutungen noch Anzeichen eines infektiösen Geschehens sichtbar. Die Retinotomie erscheint verschlossen und lässt sich makroskopisch nicht abgrenzen.

Auch nach längerer Verweildauer der Kollagenfolie im subretinalen Raum, d.h. nach 3 Wochen (Abb. 12a, b) und 5 Wochen (Abb. 14a, b), ist makroskopisch keine Netzhautablösung oder Entzündungsreaktion der Netzhaut festzustellen. Vielmehr zeigt sich eine beruhigte Augeninnenfläche ohne sichtbare Gefäßeinsprossungen oder fibrotische bzw. gliotische Netzhautveränderungen. Die Kollagenfolie ist 5 Wochen

nach Transplantation nicht mehr abgrenzbar, kann jedoch durch angiographische Aufnahmen, in denen verbliebene Folienreste aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaft der Kollagenfolie deutlich zu erkennen sind, sicher nachgewiesen werden (Abb. 20). Im Vergleich zu der fundusphotographischen Darstellung des 3 Tage alten Transplantates (Abb. 19), die kompakt und dicht in ihrer viereckigen Form imponiert, zeigt die Aufnahme der 5 Wochen verbliebenen Kollagenfolie (Abb. 20) Restbestandteile, die blasser erscheinen. Auf letzt genannter Photographie tritt ein verstärkt heller Eckpunkt hervor, der der Stelle entspricht, an welcher die zellenbesetzte Folie mit dem Mikroinstrument gehalten wurde. Es ist anzunehmen, dass hierdurch die in diesem Areal besiedelten ARPE-19-Zellen beschädigt oder entfernt wurden. Gut zu erkennen ist die immer noch vorhandene viereckige Form des ursprünglichen Transplantates. Dies lässt darauf schließen, dass die Folie während der Degradation in ihrer Lage unverändert bleibt, sich im Verlauf nicht relevant kontrahiert und Restfragmente nicht divergieren.

4.2 Histologie der subretinal transplantierten Kollagenfolie mit ARPE-19-Zellen

Die korrespondierende Histologie der verschiedenen Beobachtungszeitpunkte bestätigt die makroskopischen Beurteilungen der subretinal transplantierten Kollagenfolie.

Abbildung 7 zeigt eine transplantierte, mit ARPE-19-Zellen besiedelte Kollagenfolie im Kaninchenauge 3 Tage postoperativ im histologischen Schnitt. Bereits in der Nativaufnahme (Abb. 7a) ist die Kollagenfolie gut abzugrenzen, welche unter dem Fluoreszenzmikroskop durch die DTAF-Färbung eindeutig anhand der gelblichen Fluoreszenz identifiziert werden kann (Abb. 7b). In der HE-Färbung ist die Kollagenfolie ebenfalls gut zu erkennen, die der Choroidea in ihrer hier dargestellten gesamten Länge glatt anliegt (Abb. 7c). Bis auf eine randständige Zelle lassen sich auf dieser Photographie keine weiteren Zellen abgrenzen (Abb. 7c). Der Raum zwischen der Netzhaut und der Folie im histologischen Schnitt ist in Fixations- und

Färbungsvorgängen begründet, welche zu einer Netzhautablösung im Sinne eines histologischen Artefakts führen.

Vergleichend zur Netzhaut des nicht-transplantierten Areals (Abb. 5) zeigt sich die Gesamtarchitektur der Retina nach 3 Tagen postoperativ vollständig erhalten, ebenso wie in den Aufnahmen der transplantierten Areale nach einer Woche (Abb. 9), zwei Wochen (Abb. 11) und drei Wochen (Abb. 13) Beobachtungszeitraum. Degenerative Veränderungen sind stellenweise in der Ganglienzellschicht und der inneren Körnerzellschicht mit Hofbildungen festzustellen (Abb. 11c), wobei insbesondere die Schichtdicke der äußeren Körnerzellschicht im Verlauf abnimmt (Abb. 18). Nach 5 Wochen Nachbeobachtungszeit ist die äußere Körnerzellschicht der Retina in dem hier gezeigten Abschnitt kaum abzugrenzen (Abb. 15c). In der HE-Färbung lassen sich Umbaureaktionen mit Beteiligung verschiedener Zellen beobachten.

Die durch die Fixations- und Färbungsvorgänge bedingten abgerissenen Photorezeptoraußensegmente, welche an der neurosensorischen Retina sowie an den Zellen auf der Folie sichtbar sind, weisen auf eine zuvor bestandene Zell-Photorezeptor-Verbindung in vivo hin (Abb. 9c, 11c). Die transplantierten Zellen, die sich zwischen der Kollagenfolie und der Netzhaut befinden, kommen in den Aufnahmen nach einer und zwei Wochen Beobachtungszeit am deutlichsten zur Darstellung (Abb. 9c, 11c). Jedoch sind diese Zellen ohne spezifische Markierungen oder Färbungen nicht eindeutig als die transplantierten ARPE-19-Zellen zu identifizieren.

Die Augenschnitte nach 3 und 5 Wochen beinhalten Zellansammlungen mit Zelldetritus, die sich unterhalb der Retina befinden und stellenweise eine Pigmentierung aufweisen (Abb. 13c, 15c). In diesen Abbildungen sind nur noch Restfragmente der Kollagenfolie vorhanden, sodass eine Aussage über die Herkunft der Zellen nicht möglich ist. Ausgehend von der Zellmorphologie können am ehesten auf RPE-, gliale Zellen oder Fibroblasten geschlossen werden. In allen histologischen Aufnahmen sind keine Leukozyteninfiltrate oder andere Entzündungszellen zu beobachten und die Choroidea zeigt sich zu allen Zeitpunkten unauffällig.

4.3 Abbauverhalten der Kollagenfolie mit ARPE-19-Zellen

Die subretinal transplantierte Kollagenfolie ist bis zu 2 Wochen postoperativ, sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch, deutlich von ihrer Umgebung abgrenzbar (Abb. 6-11). Histologisch lässt sich die Folie durch ihre Struktur und andersartige Farbe bereits in den Paraffinschnitten und HE-Färbungen unter Lichtmikroskopie erkennen. Eine sichere Zuordnung ermöglicht das starke Fluoreszieren der DTAF-Färbung. Zum Ablauf von 2 Wochen zeigt die Folie Abbautendenzen im Sinne einer Anrauhung der sonst glatten Oberfläche (Abb. 11b).

Nach drei Wochen Beobachtungszeit erscheint der Abbauvorgang weiter fortgeschritten, denn makroskopisch bleibt nur ein schwach gelber Fleck (Abb. 12b), während nach 2 Wochen noch die ausgeprägt gelbe Folie sich deutlich hervorhebt (Abb. 10b). Die mikroskopische Ansicht bestätigt diese Annahme, wie auf Abbildung 13a, b und c zu sehen ist, in denen sich die ARPE-19-besetzte Kollagenfolien bis auf Restfragmente degradiert zeigen. Hierbei stellt das Transplantat im Paraffinschnitt (Abb. 13c) eine bruchstückhafte Linie dar, die am linken Ende noch als Folie erkennbar ist. Dasselbe Bild präsentiert sich in der Fluoreszenzdarstellung (Abb. 13b), was den Verdacht verifiziert. Der DTAF-Farbstoff fluoresziert im verbliebenen Foliestück und in einer zur rechten Seite hin weiterführenden Linie, die der ursprünglichen Lage der transplantierten Kollagenfolie entspricht. In diesem Bereich ist das Kollagen nahezu gänzlich abgebaut, der Restfarbstoff ist vom umliegenden Gewebe resorbiert bzw. von den umgebenden Zellen phagozytiert worden.

Der progrediente Abbauprozess zeigt sich nach 5 Wochen Beobachtungszeitraum noch eindrucksvoller (Abb. 15). Lichtmikroskopisch kann das Transplantat weder auf dem Paraffinschnitt noch in der HE-Färbung erfasst werden (Abb. 15a, c). Die Fluoreszenzmikroskopie erbringt den Beweis für den stattgehabten Abbau, da diese einen faserigen Rest der Kollagenfolie an dieser Stelle detektieren lässt (Abb. 15b).

Der längere Verbleib der Folie in diesem Areal kann ebenfalls anhand der Retina festgestellt werden. Die Netzhaut im Transplantationsareal zeigt nach längerem Verlauf ein degeneratives Verhalten im transplantierten Auge (Abb. 15c). Je länger die Folie erhalten bleibt, umso länger ist die Retina der Minderversorgung ausgesetzt und umso

ausgeprägter erscheinen die degenerativen Merkmale an dieser Stelle, ebenfalls nachvollziehbar anhand Abbildung 18. Hier zeigt sich eine transplantierte Schnittebene, an der die Kollagenfolie komplett abgebaut ist. Einzelne Zellen mit großen Zellkernen und Pigmentanteilen liegen der Choroidea auf, die der Morphologie der RPE-Zellen entsprechen und somit verbliebene Kaninchen-RPE- oder ARPE-19-Zellen, die Pigmente phagozytiert haben, sein können.

Angiographisch können die Folien aufgrund der DTAF-Färbung ebenfalls eindeutig erkannt und dargestellt werden, die sich hierbei je nach Konsistenz in Grau-Weiß-Abstufungen von der schwarz erscheinenden Augeninnenfläche hervorheben. Abbildung 19 stellt ein transplantiertes Auge nach 3 Tagen und Abbildung 20 nach 5 Wochen dar. Der Vergleich zeigt, dass die noch nach 3 Tagen komplett erhaltene Folie nach Ablauf von 5 Wochen stellenweise gänzlich abgebaut ist.

Die auf der transplantierten Kollagenfolie ausgesäten Zellen sind für einen schnelleren Abbau der Kollagenfolie verantwortlich. Die als Zeichen der beginnenden Degradation erkennbare Anrauhung der Folie ist in Richtung der Retina und somit auf die zellenbesäte Seite orientiert (Abb. 11b, c). Nach 3 Wochen Beobachtungszeitraum (Abb. 13) verbleibt von der mit den Zellen transplantierten Kollagenfolie lediglich ein Bruchteil, das makroskopisch nicht darstellbar ist (Abb. 12). Ebenso präsentieren sich die zellenbesetzten Folien nach 5 Wochen (Abb. 15), wobei nur noch faserige Anteile anhand des Fluoreszenzfarbstoffs zu detektieren sind. Wie bereits beschrieben, sind in der Angiographieaufnahme (Abb. 20) nach 5 Wochen Verweildauer die Restbestandteile in dem Bereich vorhanden, in dem eine Beschädigung oder Ablösung der transplantierten Zellen durch das Halten des Transplantats mit der Mikropinzette erwartet wird, sodass daraus auf einen schnelleren Abbau in Anwesenheit der transplantierten Zellen geschlossen werden kann. Wäre der Abbau lediglich von der Umgebung initiiert, so dürfte kein vereinzelt erhaltenes größeres Fragmentstück verbleiben.

4.4 Aufnahmen der Ergebnisse

4.4.1 Histologie: Kollagenfolie mit RPE-Zellen im subretinalen Raum (follow up: 3 Tage)

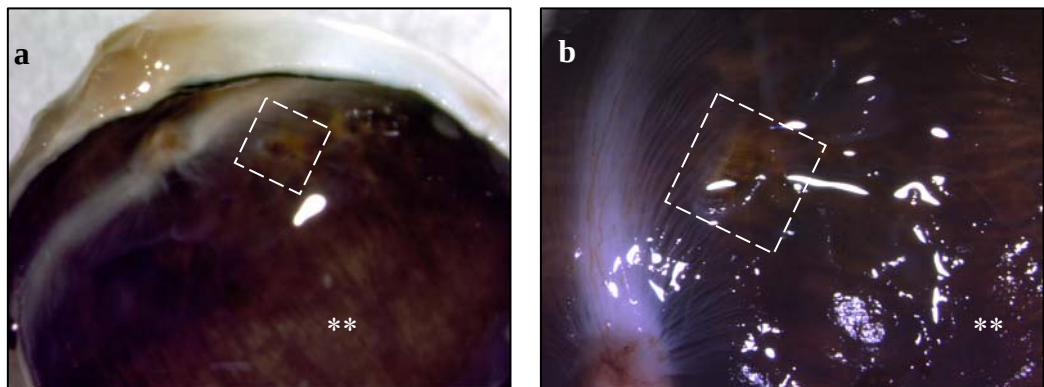


Abb. 6: Makroskopischer Schnitt eines Kaninchenauges 3 Tage nach subretinaler Transplantation einer Kollagenfolie mit ARPE-19 (Markierung). **(a)** Die Netzhaut (**) erscheint reizlos und glatt anliegend. **(b)** Die transplantierte Folie (Markierung) kommt unter dem Makroskop gelblich nahe der weißlich erscheinenden myelinisierten Nervenfasern zur Darstellung. Es sind keine sichtbaren Gewebsreaktionen vorhanden.

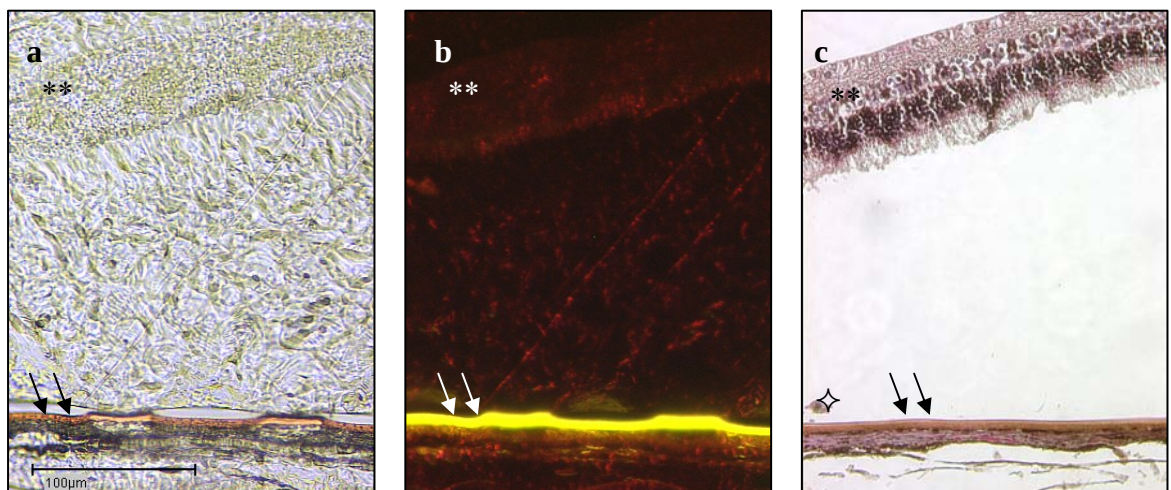


Abb. 7: Histologische Aufnahmen eines Kaninchenauges 3 Tage nach subretinaler Transplantation einer Kollagenfolie mit ARPE-19 (Pfeile). Die Netzhautabhebung ist durch die Entwässerungs- und Fixierungsvorgänge bedingt. **(a)** Paraffinschnitt, nativ, unter Durchlicht. Die transplantierte Folie ist bereits hier durch die DTAF-Färbung von der Umgebung deutlich zu unterscheiden. **(b)** Paraffinschnitt, nativ, unter Fluoreszenzlicht. Durch das gelbe Fluoreszieren ist die Folie eindeutig zu identifizieren. **(c)** HE-Färbung, unter Durchlicht. Die Folie liegt der Choroidea komplett glatt an. Vereinzelt sichtbare Zellen (◇) sind nicht eindeutig zu identifizieren. Die Retina (**) weist in ihrer Schichtung keine Veränderung auf. Ebenso sind die Außensegmente gut erhalten.

4.4.2 Histologie: Kollagenfolie mit RPE-Zellen im subretinalen Raum (follow up: 7 Tage)

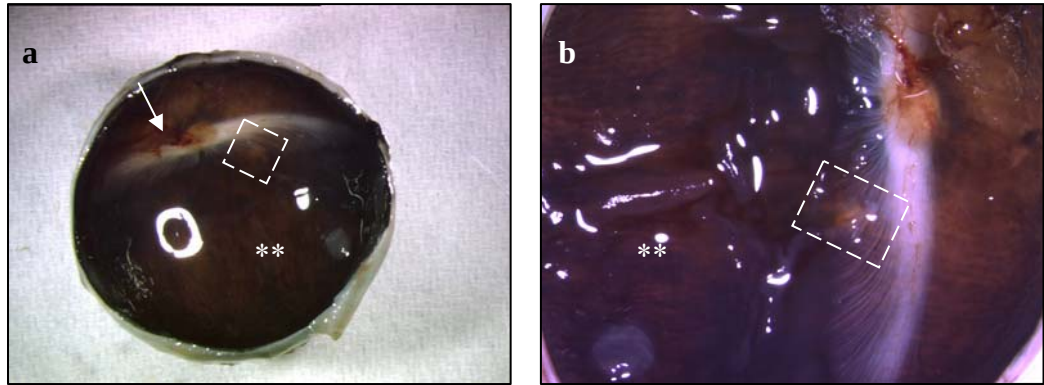


Abb. 8: Makroskopischer Schnitt eines Kaninchenauges 1 Woche nach subretinaler Transplantation einer Kollagenfolie mit ARPE-19 (Markierung). **(a)** Im Bereich der Papille (Pfeil) ist eine leichte Einblutung zu erkennen. Die Netzhaut ist reizlos. **(b)** Die Wellenbildung der Netzhaut (**) sind präparationsbedingt. Die transplantierte Folie (Markierung) ist als gelblicher Fleck sichtbar. Unter der Folie erscheint die Pigmentierung geringer ausgeprägt als in der Umgebung.

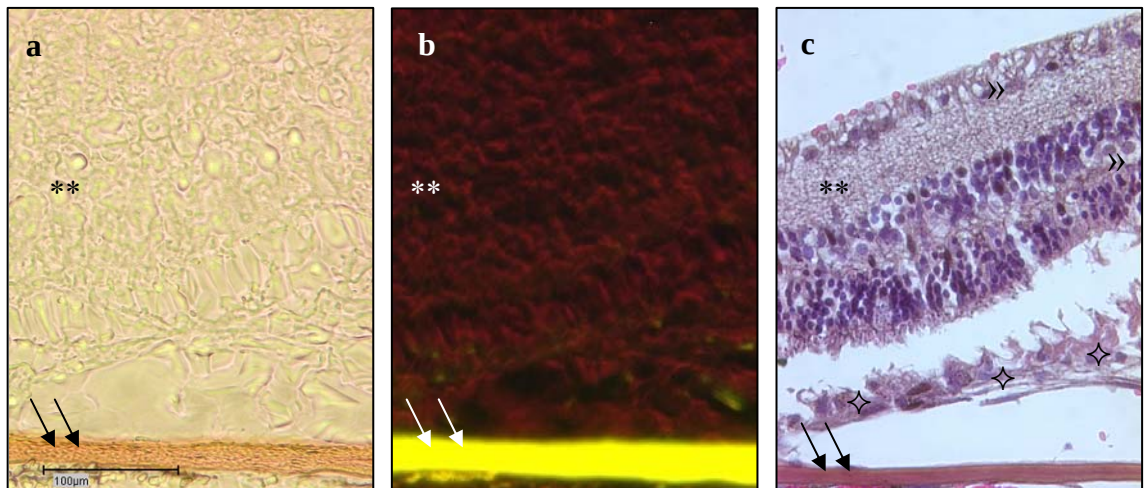


Abb. 9: Histologische Aufnahmen eines Kaninchenauges 1 Woche nach subretinaler Transplantation einer Kollagenfolie mit ARPE-19 (Pfeile). **(a)** Paraffinschnitt, nativ, unter Durchlicht. Die Kollagenfolie (Pfeile) hebt sich farblich und strukturell hervor. **(b)** Paraffinschnitt, nativ, unter Fluoreszenzlicht. Die Konturen der nahezu komplett erhaltenen Folie (Pfeile) sind durch das Fluoreszieren gut zu erkennen. **(c)** HE-Färbung, unter Durchlicht. Die transplantierte Folie (Pfeile) kommt hier glatt und flach liegend zur Darstellung. Die darauf liegenden Zellen (◇) sind als Zelllage von der Kollagenfolie abgelöst, ebenso von der Retina, was auf die Verarbeitungsprozesse zurückzuführen ist. In der Netzhaut (**) sind die einzelnen Zellschichten abgrenzbar, jedoch sind degenerative Prozesse in der Ganglienzellschicht und in den Körnerzellschichten in Form von Aufhellungen, bzw. Hofbildungen (») zu erkennen.

4.4.3 Histologie: Kollagenfolie mit RPE-Zellen im subretinalen Raum (follow up: 14 Tage)

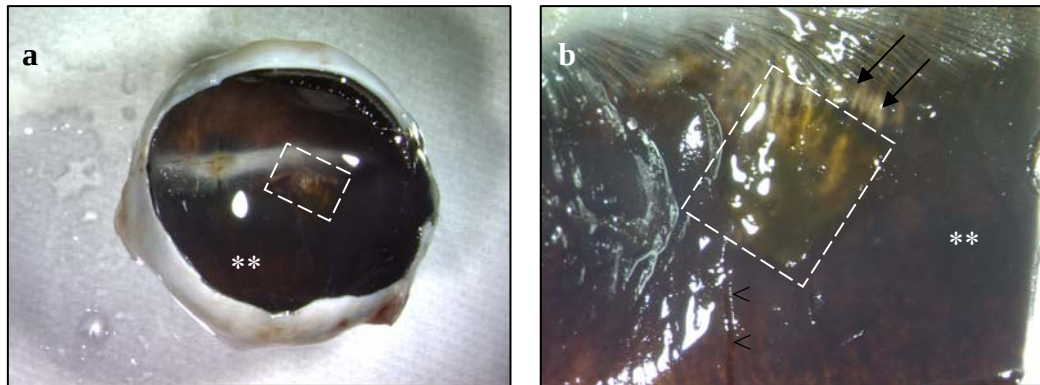


Abb. 10: Makroskopischer Schnitt eines Kaninchenauges 2 Wochen nach subretinaler Transplantation einer Kollagenfolie mit ARPE-19 (Markierung). **(a)** Der Einblick in den Augenbecher zeigt eine irritationslose und plane Netzhautumgebung (**). **(b)** Die transplantierte Folie (Markierung) ist deutlich gelb hervorgehoben durch die Retina (**). Fortgeschrittene Depigmentationen (Pfeile) der Transplantationsstelle sind als helle Flecken erkennbar. Durch die Präparation entstanden stellenweise Netzhautleinrisse.

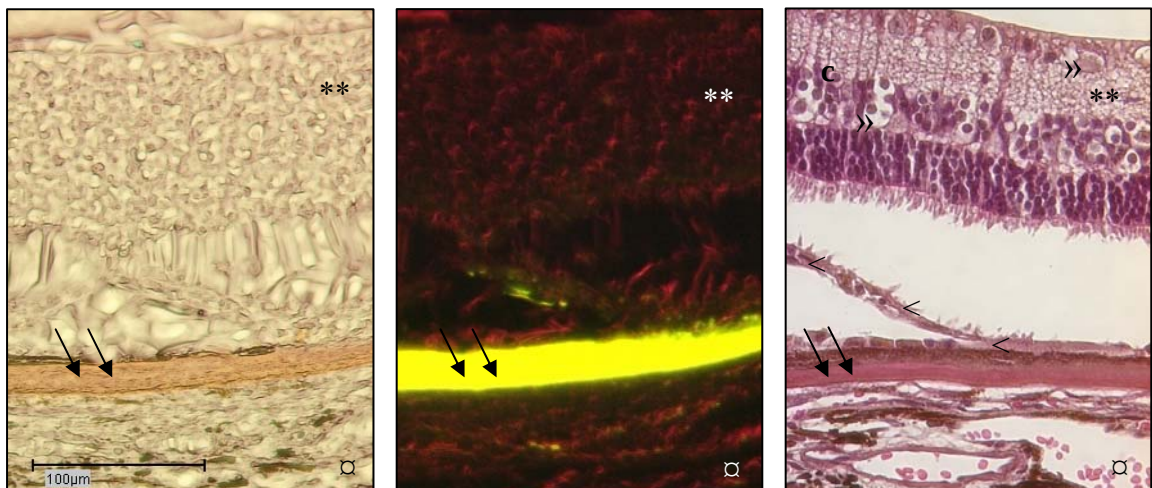


Abb. 11: Histologische Aufnahmen eines Kaninchenauges 2 Wochen nach subretinaler Transplantation einer Kollagenfolie mit ARPE-19 (Pfeile). **(a)** Paraffinschnitt, nativ, unter Durchlicht. Die Folie zeigt sich als andersfarbige Struktur zwischen der Netzhaut (**) und der Choroidea (⊖). **(b)** Paraffinschnitt, nativ, unter Fluoreszenzlicht. Die hier gelb leuchtende Folie (Pfeile) erscheint randständig in Richtung der Retina oberflächlich angeraut. **(c)** HE-Färbung, unter Durchlicht. In der HE-Färbung stellt sich die Folie (Pfeile) der Choroidea (⊖) glatt anliegend dar. Darauf sind die RPE-ähnliche Zellen zu erkennen, wobei abgerissene Außensegmentanteile (<) auf der Zellschicht erkennbar sind. Die in allen Zellschichten insgesamt gut erhaltene Retina (**) zeigt wenige Zellveränderungen (»).

4.4.4 Histologie: Kollagenfolie mit RPE-Zellen im subretinalen Raum (follow up: 21 Tage)

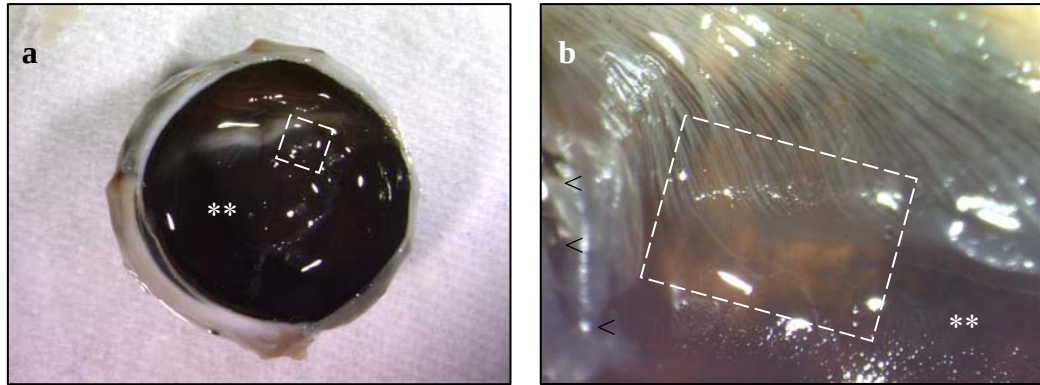


Abb. 12: Makroskopischer Schnitt eines Kaninchenauges 3 Wochen nach subretinaler Transplantation einer Kollagenfolie mit ARPE-19 (Markierung). **(a)** An der Netzhaut (**) sind makroskopisch keine Veränderungen zu erkennen. **(b)** Das transplantierte Areal (Markierung) zeigt sich blass gelblich durch die semitransparente Retina (**). Die Kollagenfolie ist nicht abgrenzbar. Die Netzhautverletzungen (<) entstanden beim Glaskörperentfernen nach Fixation sowie beim Zuschnitt.

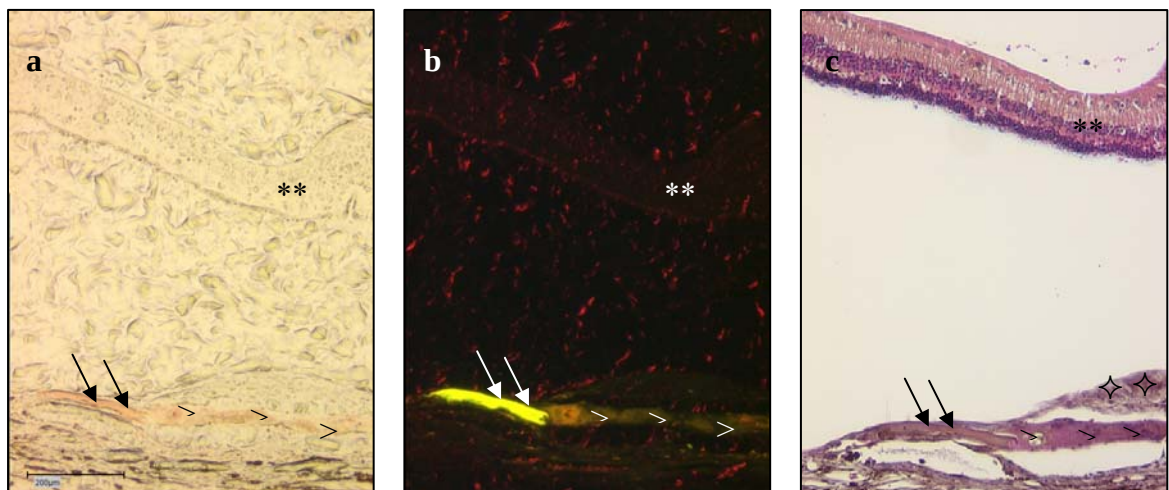


Abb. 13: Histologische Aufnahmen eines Kaninchenauges 3 Wochen nach subretinaler Transplantation einer Kollagenfolie mit ARPE-19 (Pfeile). **(a)** Paraffinschnitt, nativ, unter Durchlicht. Die Pfeile zeigen Restanteile der transplantierten Kollagenfolie. Die fleckenhaften Überreste (>) markieren die ursprüngliche Lage der abgebauten Folie. **(b)** Paraffinschnitt, nativ, unter Fluoreszenzlicht. Der Folienrest (Pfeile) ist eindeutig durch die fluoreszierende DTAF-Färbung identifizierbar. Die dem Folienstück anliegende blass fluoreszierende Linie (>) zeigt, dass die Folie an diesen Stellen bereits abgebaut wurde. **(c)** HE-Färbung, unter Durchlicht. Auch hier ist der Folienrest erkennbar (Pfeile), der abgebaute Bereich (>) erscheint zellenreich. Es sind Zell- bzw. Gewebsansammlungen (◇) oberhalb der Transplantatebene erkennbar. Die Netzhaut (**) ist vollständig in ihrer Schichtung erhalten.

4.4.5 Histologie: Kollagenfolie mit RPE-Zellen im subretinalen Raum (follow up: 35 Tage)

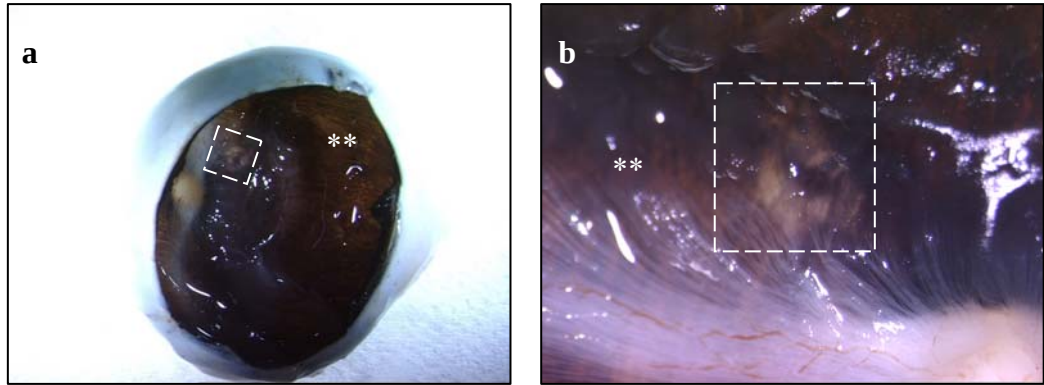


Abb. 14a, b: Makroskopischer Schnitt eines Kaninchenauges 5 Wochen nach subretinaler Transplantation einer Kollagenfolie mit ARPE-19 (Markierung). Unter dem Makroskop ist die transplantierte Stelle des Auges durch die Depigmentierung zu erkennen. Die Folie kann makroskopisch nicht erfasst werden. Die Retina (**) zeigt keine entzündlichen Reaktionen.

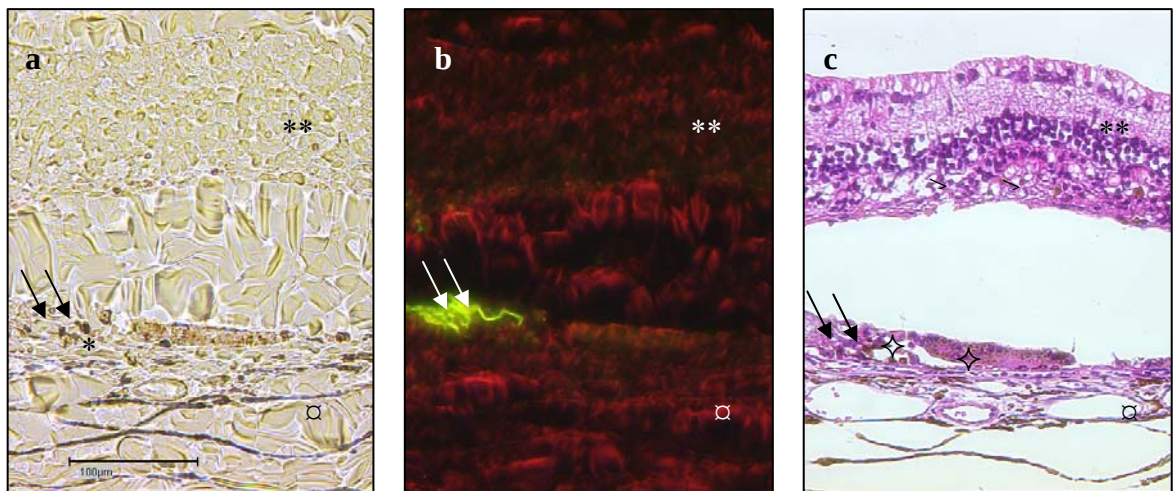


Abb. 15: Histologische Aufnahmen eines Kaninchenauges 5 Wochen nach subretinaler Transplantation einer Kollagenfolie mit ARPE-19 (Pfeile). **(a)** Paraffinschnitt, nativ, unter Durchlicht. Die Folie ist hierbei nicht zu erkennen. Die Pfeile markieren die Stelle, an der die Kollagenfolie aufgrund der Fluoreszenzdarstellung in der mittleren Aufnahme zu erwarten ist. **(b)** Paraffinschnitt, nativ, unter Fluoreszenzlicht. Hier kommen faserige Anteile der transplantierten Folie (Pfeile), die durch das DTAF-spezifische Fluoreszieren eindeutig identifizierbar sind, zur Geltung. **(c)** HE-Färbung, unter Durchlicht. Die Kollagenfolienanteile (Pfeile) sind durch Umgebungsreaktionen kaum sichtbar. Verschieden morphologisch veränderte Zellbereiche (◇) liegen der Choroidea (⊖) auf. Die Retina (**) ist in ihrem Schichtbau in den Körnerzellschichtbereichen, v. a. im Bereich der äußeren Körnerzellschicht (>) durch Umbaureaktionen verändert.

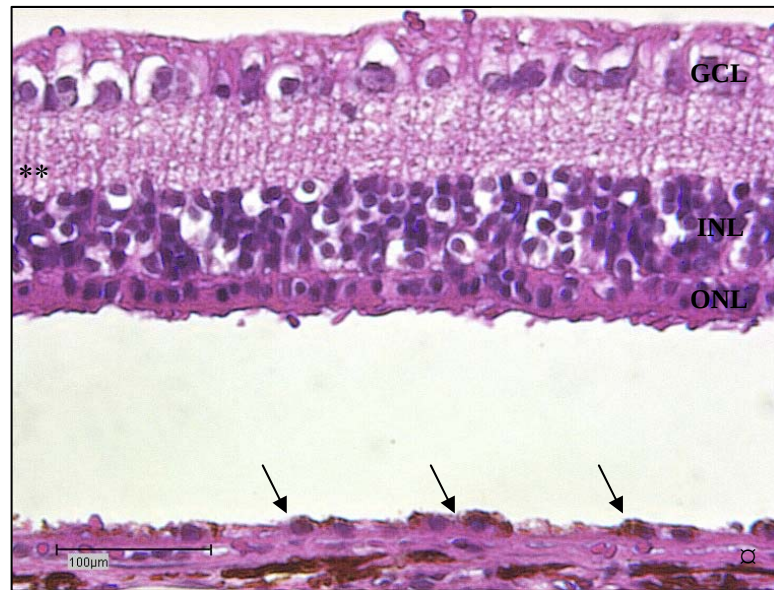


Abb. 18: HE-Färbung eines Kaninchenauges 5 Wochen nach subretinaler Transplantation einer Kollagenfolie mit Zellen. Die Retina (**) zeigt den typischen Schichtaufbau, wobei die Ganglien- (GCL) und die innere Körnerzellschicht (INL) gut erhalten, die äußere Körnerzellschicht (ONL) verschmälert ist. Einschichtig der Choroidea (Ch) aufliegend zeigen sich pigmentierte Zellen mit großen Kernen, die am ehesten RPE-Zellen entsprechen (Pfeile).

4.4.6 Angiographische Aufnahmen nach 3 und 35 Tagen

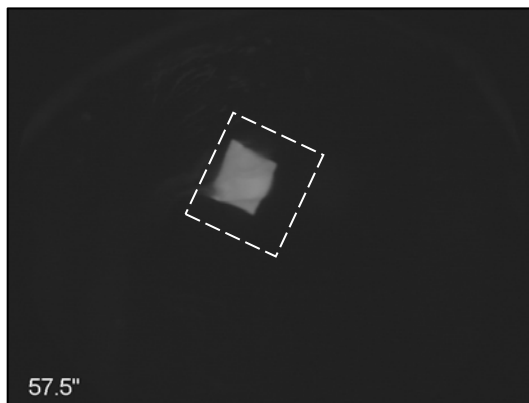


Abb. 19: Makroskopischer Schnitt eines Kaninchenauges 3 Tage nach subretinaler Transplantation einer Kollagenfolie mit ARPE-19 (Markierung). Fundusphotographie mit einer Angiographiekamera. Aufgrund der DTAF-Färbung der Folie (Markierung), kommt diese hierbei weiß zur Darstellung. Die Kollagenfolie ist vollständig erhalten. Die einzelnen Ränder der rechteckigen Folie sind zu erkennen.

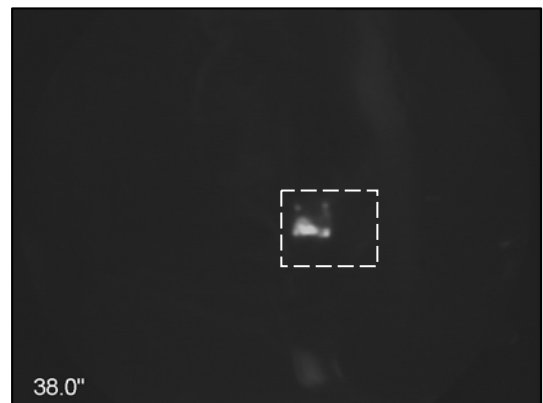


Abb. 20: Makroskopischer Schnitt eines Kaninchenauges 5 Wochen nach subretinaler Transplantation einer Kollagenfolie mit ARPE-19 (Markierung). Fundusphotographie mit einer Angiographiekamera. Die Markierung zeigt die transplantierte Kollagenfolie, die nur noch teilweise erhalten ist. Erhaltene Folienanteile in weiß sowie die Konturen der Folie, gräulicher als die Umgebung, sind gut erkennbar.

5 DISKUSSION

Die altersbedingte Makuladegeneration ist eine progressive Erkrankung der Makula und die häufigste Ursache der Altersblindheit der westlichen Industrienationen. In der Pathogenese der AMD spielt das RPE mit seinen komplexen Funktionen eine zentrale Rolle. Eine Beschädigung bzw. Degeneration des RPE resultiert in retinalem Untergang mit Visusverlust [Bressler et al. 1988; Gehrs et al. 2006].

Als kurativer Therapieansatz wurde die Transplantation von RPE bzw. IPE zum Ersatz der beschädigten oder degenerierten RPE-Zellen im subretinalen Raum von verschiedenen Gruppen bereits erfolgreich durchgeführt. Dies bewirkte jedoch nicht die erhoffte Visusverbesserung [Algvere et al. 1999; Thumann & Kirchhof 2004; Aisenbrey et al. 2006a; Tezel et al. 2007]. Als Ursache wurden mehrere Gesichtspunkte diskutiert. Frisch isolierte oder kultivierte RPE-Zellsuspensionen können auf beschädigter Bruch'scher Membran weder die physiologischen Funktionen ausüben, noch überleben [Tsukahara et al. 2002; Zarbin 2003].

Weiterhin zeigten Studien, dass transplantierte Zellsuspensionen im subretinalen Raum zur Bildung von mehrschichtigen Zellschichten neigen, welche zu pathologischen Veränderungen der darüber liegenden Netzhaut führten. Der erwünschte Monolayer, den im gesunden Auge das einschichtige RPE auf der Bruch'schen Membran bildet, war durch das alleinige Einbringen von RPE- bzw. IPE-Zelllösungen in den subretinalen Raum nicht zu reproduzieren [Wongpichedchai et al. 1992; Crafoord et al. 1999; Abe et al. 2000]. Yaji et al. transplantierten einen in vitro kultivierten RPE-Monolayer ohne Trägermaterial im Kaninchenmodell. Jedoch tendierte auch dieser vorgefertigte Monolayer zur Faltenbildung im subretinalen Raum [Yaji et al. 2009].

Im Rahmen der Therapieentwicklung für die AMD wäre in einem kurativen Ansatz parallel zur RPE-Transplantation eine Prothese der simultan beschädigten Bruch'schen Membran anzustreben, wofür eine alleinige Einbringung von RPE nicht zielführend ist. Als Konsequenz dieser Erfahrungen gilt es, ein geeignetes Trägermaterial für den Zelltransport zu finden, das einen Monolayer von Zellen mit gerichteter Polarität zum

Zielort bringt und gleichzeitig die Bruch'sche Membran vorübergehend bzw. dauerhaft ersetzt.

Da RPE der Bruch'schen Membran anhaftet und von ihren Funktionen abhängig ist, sollte ein Träger für RPE möglichst die gleichen Eigenschaften wie die Bruch'sche Membran besitzen, damit die ursprünglichen Bedingungen weiterhin aufrecht erhalten werden können. Folglich wird eine ähnliche Dicke, Dichte, Diffusionseigenschaft, Biokompatibilität und Förderung der Adhäsion der Zellen mit Begünstigung der phänotypischen Differenzierung mit Ausrichtung in der korrekten Polarität von dieser Substanz erwartet.

In dieser Arbeit wurden Kollagenfolien aus Kollagen Typ I als Trägermaterial für ARPE-19-Zellen, die subretinal in Kaninchenaugen transplantiert wurden, untersucht. Die Eignung des Kollagens zur Kultivierung von retinalen Epithelzellen konnte von mehreren Gruppen erfolgreich belegt werden. Hierzu zählt insbesondere die Unterstützung des Kollagens zur RPE-Adhäsion, zur phänotypischen epithelialen Differenzierung sowie zur Entwicklung der in vivo-Charakteristika der RPE-Zellen [Thumann et al. 2006a; Wang H et al. 2006; Lu et al. 2007; Thumann et al. 2009].

Die Kollagenfolien ließen sich gut mit dem Fluoreszenzfarbstoff DTAF zur Markierung färben und nach anschließender Kultivierung mit ARPE-19-Zellen unproblematisch zuschneiden. Ebenso war das intraoperative Einbringen mit einer Mikropinzette in den subretinalen Raum ohne Komplikationen durchführbar. Die Kollagenfolien erwiesen sich dabei stabil in ihrer Form und kamen nach der Transplantation zwischen der Choriokapillaris und der Retina ohne sich einzurollen flach zum Liegen. Auch nach dem Absaugen der zur Blasenbildung unter die Netzhaut injizierten Flüssigkeit änderte die Folie die Lage nicht. Zu den jeweiligen Auswertungszeitpunkten konnten die Kollagenfolien zwischen der Choroidea und der Netzhaut, der Choroidea glatt anliegend, auch nach weitgehendem Abbau anhand der DTAF-Färbung sicher detektiert werden.

Demgegenüber wird in der Literatur von deutlich erschwerter Handhabung für Amnionmembranen berichtet, die extrem haftend und dadurch schwer zu implantieren sind [Ohno-Matsui et al. 2006]. Ähnlich problematisch zeigt sich die Verwendung von vorderer Linsenkapsel zur subretinalen Implantation, die sich zu mehreren Lagen

einrollt und auch durch Gelbeschichtungen nicht glätten lässt [Kiilgaard et al. 2002]. Zusätzlich wurde in der Arbeit von Kiilgaard berichtet, dass kleinere Implantate nicht wieder aufgefunden werden konnten, was auf das Abschwemmen aus der Retinotomie zurückzuführen sei. Dieses Verhalten des Transplantates war bei der vorliegenden Untersuchung nicht zu beobachten.

Für weitere Materialien, vor allem synthetische, biologisch abbaubare Substanzen, die sich sehr gut für IPE- und RPE- Zellkulturen eignen, jedoch nur eingeschränkt oder gar nicht permeabel sind, wie z. B. Poly-L-Laktate, Polyhydroxybutyrate und Polyurethane, liegen bisher keine Ergebnisse für subretinale Transplantationen vor [Hadlock et al. 1999; Tezcaner et al. 2003; Williams et al. 2005; Huhtala et al. 2007].

In der avaskulären Retina des Kaninchenauges ist die Diffusion bzw. der Transport der Nährstoffe über das RPE zur Netzhaut, analog zur Makula des menschlichen Auges, von großer Bedeutung. Bereits 1995 konnte Bhatt zeigen, 2007 bestätigt von Lu et al., dass subretinal transplantierte Folien aus nativem Kollagen Typ I, den transepithelialen metabolischen Transport über die RPE-Zellen zur Retina nicht relevant beeinträchtigen. Ebenso stellte sich die Netzhaut auch in der vorgelegten Arbeit bis zu 3 Wochen nach Transplantation insgesamt erhalten dar, was sich auf die aufrechterhaltene Versorgung über das Transplantat zurückführen lässt. Nach 5 Wochen war eine beginnende Degeneration der neurosensorischen Retina zu beobachten, die sich in einer Abnahme der einzelnen Schichtdicken, vor allem der äußeren Körnerzellschicht, äußerte. Subretinal transplantierte Kollagenfolien gleichen Typs, jedoch ohne Zellbesiedelung, zeigen nach mehreren Wochen Verbleib die gleiche degenerative Veränderung der Netzhaut [Thumann et al. 2009]. Dies stützt die Vermutung, dass die Diffusion durch die Folie im zeitlichen Verlauf abnimmt, was wiederum degenerative Veränderungen begünstigt.

Entsprechend den Beschreibungen von Del Priore, welcher Gelatine als Trägermaterial verwendete, waren ebenfalls degenerative Veränderungen der Photorezeptoraußensegmente nach 2,5 Wochen sowie nach 4 Wochen festzustellen, die sich jedoch nach einem Verlauf von 3 Monaten regenerierten [Del Priore et al. 2004]. Da der längste Untersuchungszeitraum der vorgelegten Arbeit 5 Wochen betrug, kann vermutet werden, dass sich die ähnlich wie in den Untersuchungen von Del Priore

darstellenden Verkürzungen der Photorezeptoraußensegmente ebenfalls nach längerem Verlauf regenerieren werden. Die in Gelatine eingebetteten, transplantierten Zellen bildeten in vivo nicht die erwünschten Monolayer, sondern mehrschichtige Zelllagen, die auf nachfolgende Kontraktionen des Transplantats zurückgeführt wurden [Del Priore et al. 2004]. Die bei 4 °C fest vorliegende Gelatine geht bei Körpertemperatur innerhalb von 2 h in Lösung, so dass dieses Material nur für Transplantationen mit in sich stabilen Zellkonstrukten in Frage käme [Huang et al. 1998].

Als ein Nachteil des Kollagens als Substrat in RPE-Zellkulturen wurde eine Hochregulation des angiogenen Faktors festgestellt, die eine Neovaskularisation in vivo begünstigen kann [Imai et al. 2007]. Als Lösungsansatz wäre die intraoperative Applikation eines antiangiogenen Medikamentes, die derzeit erfolgreich angewandt werden, vorstellbar. Zur Inhibition einer Neovaskularisation werden derzeit 4-wöchentliche intraokuläre Injektionen, mit beispielsweise Ranibizumab, als ausreichend angesehen. Würde daher intraoperativ ein antiangiogenes Medikament verabreicht werden, würde dieses in der Zeit bis zur vollständigen Degradation der Kollagenfolie eine eventuelle Neovaskularisation verhindern [Position of the Retinological Society, the German Ophthalmological Society and the Professional Association of Ophthalmologists in Germany on the current therapeutic possibilities for neovascular age-related macular degeneration 2007].

Als möglicher autologer Träger wurde eine Membran, gebildet aus Kryopräzipitaten aus dem Blutplasma und aus der Extrazellulärmatrix des RPE, in Erwägung gezogen. Diese Kryopräzipitate bestehen zum größten Teil aus Fibrinogen und Fibronectin. Fibrinogen wurde bereits im Rahmen der subretinalen RPE-Transplantation untersucht und führte in vivo zu einer lokalen inflammatorischen Reaktion [Oganesian et al. 1999].

Im Ergebnis der vorgelegten Studie konnte für die Kollagenfolie insgesamt eine sehr gute Biokompatibilität gezeigt werden. Bis auf die oben beschriebenen Verkürzungen der äußeren Körnerzellschicht und der Photorezeptoraußensegmente zeigt die apikal an die Folie grenzende Netzhaut sowie die basolateral anliegende Choroidea keine Entzündungsreaktion, Fibrose oder Anzeichen einer Abstoßungsreaktion. Im Gegensatz zu den hier vorgestellten Ergebnissen der Kollagenfolie konnten nach Implantation von z. B. vorderer Linsenkapsel und Amnionmembran gravierende Reaktionen der

Umgebung beobachtet werden.

Die vordere Linsenkapsel war in ihrer nativen Form für die Zellanhaftung und Zelldifferenzierung gut geeignet, für Nährstoffe jedoch nicht permeabel, was nach Transplantation im subretinalen Raum zur Degeneration der Retina führte [Nicolini et al 2000; Turowski et al. 2004]. Eine Beschichtung der Linsenkapsel mit Gelatine führte in allen beobachteten Fällen zu inflammatorischen Reaktionen des Transplantationsareals, ohne dass eine bakterielle Infektion nachgewiesen werden konnte [Kiilgaard et al. 2002]. Bei Einsatz von Amnionmembranen, die ebenfalls für die RPE-Kultivierung gute Ergebnisse zeigten, ergab sich nach subretinaler Transplantation eine Atrophie der darüber liegenden Netzhaut, da die Permeabilität durch die Dicke der Membran, die zwischen 30 und 100 μm lag, eingeschränkt war [Singhal & Vemuganti 2005; Ohno-Matsui et al. 2006]. Auf einer allogenen Descemet-Membran kann sich sowohl RPE als auch IPE adäquat entwickeln, wobei diese Membran die etwa doppelte Dicke der Bruch'schen Membran aufweist [Thumann et al. 1997].

In der hier vorgelegten Arbeit sind die mit ARPE-19-Zellen besiedelten Kollagenfolien nach zwei Wochen mit Anzeichen beginnender Degradation, nach drei Wochen zunehmend abgebaut und nach fünf Wochen Beobachtungszeitraum lediglich anhand faseriger Restbestandteile nachweisbar. Ohne Zellbesiedelung subretinal transplantierte Kollagenfolien gleicher Herkunft waren nach sechzehn Wochen postoperativem Verlauf nahezu vollständig erhalten [Thumann et al. 2009].

Aus der längeren Verweildauer der Kollagenfolie kann geschlossen werden, dass der Abbau der Folie nahezu ausschließlich auf die Besiedelung mit ARPE-19-Zellen zurückzuführen ist.

Dies bedeutet, dass die zellbesiedelten Folien durch die schnellere Degradation eine geringere Irritation der neuronalen Retina verursachen.

Die nach fünf Wochen Beobachtungszeitraum verbliebenen Folienreste befinden sich je an einer Ecke der transplantierten Kollagenfolien, am ehesten als eine Folge der Manipulation mit der Mikropinzette. Das Greifen der Folie mit der Mikropinzette während des Transplantierens könnte die Zellen in diesem Areal beschädigt oder entfernt haben. Als Werkzeugalternative zur Mikropinzette käme beispielsweise die Verwendung eines auf Unterdruckbasis arbeitenden Injektors in Frage, welcher zudem

eine kleinere Retinotomie benötigen würde [Thumann et al. 2006b]. Als Verfahrensalternative zum Abladieren der Retina mit Blasenbildung durch NaCl-Unterspritzung, wodurch Photorezeptoraußensegmente beschädigt werden, wäre eine weniger traumatische, enzymatische Netzhautablösung denkbar.

Während des Platzierens des Transplantats im subretinalen Raum wird das lokale RPE beschädigt, was sich durch depigmentierte Areale in den makroskopischen Aufnahmen in dieser Arbeit darstellte. Im Rahmen der AMD-Therapie wären dies ohnehin die zu ersetzenden Zellen, so dass der Untergang der ursprünglichen Zellen folgenlos bliebe und erwünscht wäre. Die darunter liegende Bruch'sche Membran könnte möglicherweise durch die Neubildung einer extrazellulären Matrix durch die transplantierten RPE-Zellen, die auch in der Lage sind, Proteine der Bruch'schen Membran zu bilden, wiederhergestellt werden [van Soest et al. 2007].

Es wäre eine Option zur selektiven Steuerung der Zersetzungsgeschwindigkeit der Kollagenfolie, diese mit abbauenden Enzymen zu versetzen. Dadurch wäre beispielsweise die Beschränkung des Degradationszeitraums auf 3 Wochen denkbar.

Vom genauen Abbauverhalten der Amnionmembran im subretinalen Raum existieren in der Literatur keine Daten. In einer Untersuchung, in der Amnionmembranen oral transplantiert wurden, berichten die Autoren, die Membranen seien nach 3 Wochen nicht mehr auffindbar gewesen [Samandari et al. 2004], wobei die digestiven Enzyme im Mund einen schnelleren Abbau ermöglichen als implantiertes Gewebe anderer Körperpartien. Andere Studien zeigen Ergebnisse von subretinal transplantierten Amnionmembranen, die nach 12 Wochen noch gut erhalten detektiert werden konnten [Ohno-Matsui et al. 2006]. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der subretinale Abbau von Amnionmembranen einen längeren Zeitraum in Anspruch nimmt als die Kollagenfolien.

Für die vordere Linsenkapsel konnte eine biologische Abbaubarkeit bisher nicht gezeigt werden. In einer Studie, in der die vordere Linsenkapsel subretinal transplantiert wurde, waren die Transplantate nach 49 Tagen noch komplett erhalten [Kiilgaard et al. 2002].

Poly-L-Laktate, Glykosylierte Poly-L-Laktate und Polyhydroxybutyrate sind zwar biologisch abbaubar, wurden jedoch bisher nicht auf Eignung im subretinalen Raum untersucht [Hadlock et al. 1999; Tezcaner et al. 2003]. Polyurethane wie Pellethane,

Tecoflex und Zytar können so wie Polyester im Körper nicht abgebaut werden und wurden bisher ebenfalls nicht subretinal eingesetzt [Williams et al. 2005]. Evaluiert werden gegenwärtig 6 – 100 µm dicke Folien aus Polymethylmethacrylat, Poly-Laktat-co-Glykolsäure und Polyhydroxyvalerat mit poriger Mikrostruktur, die eine dreidimensionale persistierende Adhäsion der Zellen ermöglichen. Somit soll während und nach der Transplantation eine manipulationsresistente definierte Lage der Zellen erhalten bleiben [Tao et al. 2007; Neeley et al. 2008; Tezcaner & Hicks 2008].

Die hier transplantierten ARPE-19-Zellen ließen sich postoperativ nicht sicher von umliegenden lokalen RPE-Zellen abgrenzen, insbesondere nach Zersetzung der Kollagenfolie. Durch Phagozytose von Pigmenten gleichen die zuvor pigmentfreien ARPE-19-Zellen dem bereits vorhandenen RPE. Um die postoperative Identifikation der transplantierten Zellen zu ermöglichen, sollten diese vor der Transplantation markiert werden. Denkbar wäre auch, bei den Forschungsarbeiten statt dessen pigmentiertes RPE als Transplantat in Albino-Kaninchenaugen zu verwenden.

Im Hinblick auf die Verwendbarkeit als Trägermaterial für die subretinale Transplantation von retinalen Pigmentepithelzellen erweist sich die in dieser Arbeit verwendete Kollagenfolie daher als besonders geeignet. Sowohl die Bioverträglichkeit als auch die Bioabbaubarkeit der Kollagenfolie im subretinalen Raum, besonders in Verbindung mit der Besiedelung durch RPE-Zellen, die den anderen hier aufgeführten Materialien überlegen sind, sprechen besonders für einen Einsatz der Kollagenfolie in diesem Bereich.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende experimentelle Arbeit befasst sich mit der Transplantation von Kollagenfolie als Träger für Zellen im subretinalen Raum zum Ersatz von retinalen Pigmentepithelzellen (RPE) als kurative Therapiemaßnahme für die altersbedingte Makuladegeneration (AMD). Hierfür wurden die Biokompatibilität und die Eignung von Kollagenfolie als Trägermaterial für RPE-Zellen im subretinalen Raum des Kaninchenauges untersucht.

Die Versuchsreihe schloss insgesamt 12 Tiere mit je einem operierten Auge ein. Auf mit dem Fluoreszenzfarbstoff DTAF gefärbten Kollagenfolien wurden ARPE-19 Zellen kultiviert. Nach Erschaffung eines Zugangs mittels pars plana Vitrektomie wurde im Operationsgebiet durch subretinale Injektion von physiologischer Kochsalzlösung eine Blase gebildet. Über eine Retinotomie der hierdurch abladierten Retina erfolgte die Transplantation der Folie. Der Beobachtungszeitraum betrug jeweils zwischen 3 und 35 Tagen. Die Kaninchenaugen wurden makroskopisch sowie mikroskopisch beurteilt, wobei die histologische Aufarbeitung in Paraffintechnik und die morphologische Auswertung nativ, unter Fluoreszenz sowie nach HE-Färbung durchgeführt wurde.

Die mit DTAF gut färbbare Folie erwies sich in ihrer Form sowohl vor, als auch nach dem Kultivieren der Zellen, beim Zuschnitt ebenso wie beim Transplantieren, als stabil. Die mit ARPE-19-Zellen besiedelten Kollagenfolien waren postoperativ bis zu zwei Wochen nahezu vollständig erhalten und zeigten sich nach 3 Wochen teilweise, nach 5 Wochen nahezu komplett abgebaut. Bis zu 2 Wochen war keine gliotischen oder fibrotischen Reaktion des umliegenden Gewebes nachweisbar. Nach 3 Wochen war bei einer intakten Retina eine Zellvermehrung im Rahmen der Abbauvorgänge der Folie zu sehen. Im weiteren Verlauf waren eine Reduktion der Photorezeptoraußensegmente und eine Verschmälerung der Körnerzellschicht abgrenzbar.

Die Kollagenfolie stellte sich im Rahmen dieser Arbeit als ein zuverlässiges Trägermaterial für ARPE-19-Zellen dar, welches durch seine spezifischen Materialcharakteristika eine leichte Handhabung ermöglichte, ein schnelles Abbauverhalten bei Zellbesiedelung zeigte und aufgrund der guten Bioverträglichkeit im subretinalen Raum der Kaninchenaugen zu keiner toxischen oder Abstoßungsreaktion führte.

7 LITERATURVERZEICHNIS

2007. [Position of the Retinological Society, the German Ophthalmological Society and the Professional Association of Ophthalmologists in Germany on the current therapeutic possibilities for neovascular age-related macular degeneration]. *Klin.Monbl.Augenheilkd.* 224.559-66.
- Abe, T., Tomita, H., Kano, T., Yoshida, M., Ohashi, T., Nakamura, Y., Nishikawa, S., and Tamai, M. 2000. Autologous iris pigment epithelial cell transplantation in monkey subretinal region. *Curr.Eye Res.* 20.268-75.
- Aisenbrey, S., Lafaut, B. A., Szurman, P., Grisanti, S., Luke, C., Krott, R., Thumann, G., Fricke, J., Neugebauer, A., Hilgers, R. D., Esser, P., Walter, P., and Bartz-Schmidt, K. U. 2002. Macular translocation with 360 degrees retinotomy for exudative age-related macular degeneration. *Arch.Ophthalmol.* 120.451-9.
- Aisenbrey, S., Lafaut, B. A., Szurman, P., Hilgers, R. D., Esser, P., Walter, P., Bartz-Schmidt, K. U., and Thumann, G. 2006. Iris pigment epithelial translocation in the treatment of exudative macular degeneration: a 3-year follow-up. *Arch.Ophthalmol.* 124.183-8.
- Aisenbrey, S., Zhang, M., Bacher, D., Yee, J., Brunken, W. J., and Hunter, D. D. 2006. Retinal pigment epithelial cells synthesize laminins, including laminin 5, and adhere to them through alpha3- and alpha6-containing integrins. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 47.5537-44.
- Aisenbrey, S., Bartz-Schmidt, K. U., Walter, P., Hilgers, R. D., Ayerley, H., Szurman, P., and Thumann, G. 2007. Long-term follow-up of macular translocation with 360 degrees retinotomy for exudative age-related macular degeneration. *Arch.Ophthalmol.* 125.1367-72.
- Algere, P. V., Gouras, P., and Dørgard, Kopp E. 1999. Long-term outcome of RPE allografts in non-immunosuppressed patients with AMD. *Eur.J.Ophthalmol.* 9.217-30.

- Alluin, O., Wittmann, C., Marqueste, T., Chabas, J. F., Garcia, S., Lavaut, M. N., Guinard, D., Feron, F., and Decherchi, P. 2009. Functional recovery after peripheral nerve injury and implantation of a collagen guide. *Biomaterials* 30.363-73.
- Amyot, F., Small, A., Boukari, H., Sackett, D., Elliott, J., McDaniel, D., Plant, A., and Gandjbakhche, A. 2008. Thin films of oriented collagen fibrils for cell motility studies. *J.Biomed.Mater.Res.B Appl.Biomater.* 86B.438-43.
- Augood, C. A., Vingerling, J. R., de Jong, P. T., Chakravarthy, U., Seland, J., Soubrane, G., Tomazzoli, L., Topouzis, F., Bentham, G., Rahu, M., Vioque, J., Young, I. S., and Fletcher, A. E. 2006. Prevalence of age-related maculopathy in older Europeans: the European Eye Study (EUREYE). *Arch.Ophthalmol.* 124.529-35.
- Augustin, A. J., Puls, S., and Offermann, I. 2007. Triple therapy for choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration: verteporfin PDT, bevacizumab, and dexamethasone. *Retina* 27.133-40.
- Baehr, W., Wu, S. M., Bird, A. C., and Palczewski, K. 2003. The retinoid cycle and retina disease. *Vision Res.* 43.2957-8.
- Bhatt, N. S., Newsome, D. A., Fenech, T., Hessburg, T. P., Diamond, J. G., Miceli, M. V., Kratz, K. E., and Oliver, P. D. 1994. Experimental transplantation of human retinal pigment epithelial cells on collagen substrates. *Am.J.Ophthalmol.* 117.214-21.
- Bhutto, I. A., Uno, K., Merges, C., Zhang, L., McLeod, D. S., and Luty, G. A. 2008. Reduction of endogenous angiogenesis inhibitors in Bruch's membrane of the submacular region in eyes with age-related macular degeneration. *Arch.Ophthalmol.* 126.670-8.
- Blakeslee, D. and Baines, M. G. 1976. Immunofluorescence using dichlorotriazinylaminofluorescein (DTAF). I. Preparation and fractionation of labelled IgG. *J.Immunol.Methods* 13.305-20.

- Bloomfield, S. E., Miyata, T., Dunn, M. W., Bueser, N., Stenzel, K. H., and Rubin, A. L. 1978. Soluble gentamicin ophthalmic inserts as a drug delivery system. *Arch.Ophthalmol.* 96.885-7.
- Bok, D. 1993. The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *J.Cell Sci.Suppl* 17.189-95.
- Booij, J. C., van Soest, S., Swagemakers, S. M., Essing, A. H., Verkerk, A. J., van der Spek, P. J., Gorgels, T. G., and Bergen, A. A. 2009. Functional annotation of the human retinal pigment epithelium transcriptome. *BMC Genomics* 10.164.
- Booij, J. C., Baas, D. C., Beisekeeva, J., Gorgels, T. G., and Bergen, A. A. 2010. The dynamic nature of Bruch's membrane. *Prog.Retin.Eye Res.* 29.1-18.
- Bost, L. M., Aotaki-Keen, A. E., and Hjelmeland, L. M. 1994. Cellular adhesion regulates bFGF gene expression in human retinal pigment epithelial cells. *Exp.Eye Res.* 58.545-52.
- Boulton, M. and Dayhaw-Barker, P. 2001. The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. *Eye* 15.384-9.
- Bressler, N. M., Bressler, S. B., and Fine, S. L. 1988. Age-related macular degeneration. *Surv.Ophthalmol.* 32.375-413.
- Bressler, N. M., Silva, J. C., Bressler, S. B., Fine, S. L., and Green, W. R. 1994. Clinicopathologic correlation of drusen and retinal pigment epithelial abnormalities in age-related macular degeneration. *Retina* 14.130-42.
- Brown, D. M., Kaiser, P. K., Michels, M., Soubrane, G., Heier, J. S., Kim, R. Y., Sy, J. P., and Schneider, S. 2006. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *N.Engl.J.Med.* 355.1432-44.
- Campochiaro, P. A., Hackett, S. F., Viores, S. A., Freund, J., Csaky, C., LaRochelle, W., Henderer, J., Johnson, M., Rodriguez, I. R., Friedman, Z., and . 1994. Platelet-derived growth factor is an autocrine growth stimulator in retinal pigmented epithelial cells. *J.Cell Sci.* 107 (Pt 9).2459-69.

- Cashman, S. M., Bowman, L., Christofferson, J., and Kumar-Singh, R. 2006. Inhibition of choroidal neovascularization by adenovirus-mediated delivery of short hairpin RNAs targeting VEGF as a potential therapy for AMD. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 47.3496-504.
- Castellarin, A. A., Sugino, I. K., Vargas, J. A., Parolini, B., Lui, G. M., and Zarbin, M. A. 1998. In vitro transplantation of fetal human retinal pigment epithelial cells onto human cadaver Bruch's membrane. *Exp.Eye Res.* 66.49-67.
- Chan, C. K., Meyer, C. H., Gross, J. G., Abraham, P., Nuthi, A. S., Kokame, G. T., Lin, S. G., Rauser, M. E., and Kaiser, P. K. 2007. Retinal pigment epithelial tears after intravitreal bevacizumab injection for neovascular age-related macular degeneration. *Retina* 27.541-51.
- Chaudhary, V., Mao, A., Hooper, P. L., and Sheidow, T. G. 2007. Triamcinolone acetonide as adjunctive treatment to verteporfin in neovascular age-related macular degeneration: a prospective randomized trial. *Ophthalmology* 114.2183-9.
- Chvapil, M. 1977. Collagen sponge: theory and practice of medical applications. *J.Biomed.Mater.Res.* 11.721-41.
- Coleman, H. R., Chan, C. C., Ferris, F. L., III, and Chew, E. Y. 2008. Age-related macular degeneration. *Lancet* 372.1835-45.
- Crabb, J. W., Miyagi, M., Gu, X., Shadrach, K., West, K. A., Sakaguchi, H., Kamei, M., Hasan, A., Yan, L., Rayborn, M. E., Salomon, R. G., and Hollyfield, J. G. 2002. Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99.14682-7.
- Crafoord, S., Algvere, P. V., Seregard, S., and Kopp, E. D. 1999. Long-term outcome of RPE allografts to the subretinal space of rabbits. *Acta Ophthalmol.Scand.* 77.247-54.
- Davis, F. A. 1929. The Anatomy and Histology of the Eye and Orbit of the Rabbit. *Trans.Am.Ophthalmol.Soc.* 27.400-41.

- Del Priore, L. V. and Tezel, T. H. 1998. Reattachment rate of human retinal pigment epithelium to layers of human Bruch's membrane. *Arch.Ophthalmol.* 116.335-41.
- Del Priore, L. V., Kaplan, H. J., Tezel, T. H., Hayashi, N., Berger, A. S., and Green, W. R. 2001. Retinal pigment epithelial cell transplantation after subfoveal membranectomy in age-related macular degeneration: clinicopathologic correlation. *Am.J.Ophthalmol.* 131.472-80.
- Del Priore, L. V., Tezel, T. H., and Kaplan, H. J. 2004. Survival of allogeneic porcine retinal pigment epithelial sheets after subretinal transplantation. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 45.985-92.
- DeVore, D. P., Scott, J. B., Nordquist, R. E., Hoffman, R. S., Nguyen, H., and Eiferman, R. A. 1995. Rapidly polymerized collagen gel as a smoothing agent in excimer laser photoablation. *J.Refract.Surg.* 11.50-5.
- Doillon, C. J., Drouin, R., Cote, M. F., Dallaire, N., Pageau, J. F., and Laroche, G. 1997. Chemical inactivators as sterilization agents for bovine collagen materials. *J.Biomed.Mater.Res.* 37.212-21.
- Doillon, C. J., Watsky, M. A., Hakim, M., Wang, J., Munger, R., Laycock, N., Osborne, R., and Griffith, M. 2003. A collagen-based scaffold for a tissue engineered human cornea: physical and physiological properties. *Int.J.Artif.Organs* 26.764-73.
- Eberli, D., Filho, L. F., Atala, A., and Yoo, J. J. 2008. Composite scaffolds for the engineering of hollow organs and tissues. *Methods.*
- el Matri, L., Chebil, A., Kort, F., Bouraoui, R., Baklouti, K., and Mghaieth, F. 2010. Intravitreal injection of triamcinolone combined with bevacizumab for choroidal neovascularization associated with large retinal pigment epithelial detachment in age-related macular degeneration. *Graefes Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.* 248.779-84.
- Elliott, J. T., Woodward, J. T., Langenbach, K. J., Tona, A., Jones, P. L., and Plant, A. L. 2005. Vascular smooth muscle cell response on thin films of collagen. *Matrix Biol.* 24.489-502.

- Elsdale, T. and Bard, J. 1972. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J.Cell Biol.* 54.626-37.
- Evans, J. R. and Henshaw, K. 2008. Antioxidant vitamin and mineral supplements for preventing age-related macular degeneration. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* CD000253.
- Ferris, F. L., III, Fine, S. L., and Hyman, L. 1984. Age-related macular degeneration and blindness due to neovascular maculopathy. *Arch.Ophthalmol.* 102.1640-2.
- Finnemann, S. C. 2003. Focal adhesion kinase signaling promotes phagocytosis of integrin-bound photoreceptors. *EMBO J.* 22.4143-54.
- Folkman, J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat.Med.* 1.27-31.
- Freed, L. E., Vunjak-Novakovic, G., Biron, R. J., Eagles, D. B., Lesnoy, D. C., Barlow, S. K., and Langer, R. 1994. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Biotechnology (N.Y.)* 12.689-93.
- Friedman, D. S., O'Colmain, B. J., Munoz, B., Tomany, S. C., McCarty, C., de Jong, P. T., Nemesure, B., Mitchell, P., and Kempen, J. 2004. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch.Ophthalmol.* 122.564-72.
- Gal, A., Li, Y., Thompson, D. A., Weir, J., Orth, U., Jacobson, S. G., Apfelstedt-Sylla, E., and Vollrath, D. 2000. Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat.Genet.* 26.270-1.
- Gehrs, K. M., Anderson, D. H., Johnson, L. V., and Hageman, G. S. 2006. Age-related macular degeneration--emerging pathogenetic and therapeutic concepts. *Ann.Med.* 38.450-71.
- Gigante, A., Bevilacqua, C., Cappella, M., Manzotti, S., and Greco, F. 2003. Engineered articular cartilage: influence of the scaffold on cell phenotype and proliferation. *J.Mater.Sci.Mater.Med.* 14.713-6.

- Gingras, M., Paradis, I., and Berthod, F. 2003. Nerve regeneration in a collagen-chitosan tissue-engineered skin transplanted on nude mice. *Biomaterials* 24.1653-61.
- Giordano, G. G., Thomson, R. C., Ishaug, S. L., Mikos, A. G., Cumber, S., Garcia, C. A., and Lahiri-Munir, D. 1997. Retinal pigment epithelium cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *J.Biomed.Mater.Res.* 34.87-93.
- Glowacki, J. and Mizuno, S. 2008. Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers* 89.338-44.
- Goissis, G., Marcantonio E Jr, Marcantonio, R. A., Lia, R. C., Cancian, D. C., and de Carvalho, W. M. 1999. Biocompatibility studies of anionic collagen membranes with different degree of glutaraldehyde cross-linking. *Biomaterials* 20.27-34.
- Gong, J., Sagiv, O., Cai, H., Tsang, S. H., and Del Priore, L. V. 2008. Effects of extracellular matrix and neighboring cells on induction of human embryonic stem cells into retinal or retinal pigment epithelial progenitors. *Exp.Eye Res.* 86.957-65.
- Gragoudas, E. S., Adamis, A. P., Cunningham, E. T., Jr., Feinsod, M., and Guyer, D. R. 2004. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N.Engl.J.Med.* 351.2805-16.
- Groning, R., Cloer, C., Georgarakis, M., and Muller, R. S. 2007. Compressed collagen sponges as gastroretentive dosage forms: in vitro and in vivo studies. *Eur.J.Pharm.Sci.* 30.1-6.
- Gugala, Z., Davis, A. R., Fouletier-Dilling, C. M., Gannon, F. H., Lindsey, R. W., and Olmsted-Davis, E. A. 2007. Adenovirus BMP2-induced osteogenesis in combination with collagen carriers. *Biomaterials* 28.4469-79.
- Hadjipanayi, E., Mudera, V., and Brown, R. A. 2008. Close dependence of fibroblast proliferation on collagen scaffold matrix stiffness. *J.Tissue Eng Regen.Med.*
- Hadlock, T., Singh, S., Vacanti, J. P., and McLaughlin, B. J. 1999. Ocular cell monolayers cultured on biodegradable substrates. *Tissue Eng* 5.187-96.

- Harkness, J. E. 1987. Rabbit husbandry and medicine. *Vet.Clin.North Am.Small Anim Pract.* 17.1019-44.
- Hartmann, U., Sistani, F., and Steinhorst, U. H. 1999. Human and porcine anterior lens capsule as support for growing and grafting retinal pigment epithelium and iris pigment epithelium. *Graefes Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.* 237.940-5.
- Heussen, F. M., Fawzy, N. F., Joeres, S., Lux, A., Maaijwee, K., Meurs, J. C., Kirchhof, B., and Jousen, A. M. 2008. Autologous translocation of the choroid and RPE in age-related macular degeneration: 1-year follow-up in 30 patients and recommendations for patient selection. *Eye* 22.799-807.
- Hewitt, A. T., Nakazawa, K., and Newsome, D. A. 1989. Analysis of newly synthesized Bruch's membrane proteoglycans. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 30.478-86.
- Ho, T. C. and Del Priore, L. V. 1997. Reattachment of cultured human retinal pigment epithelium to extracellular matrix and human Bruch's membrane. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 38.1110-8.
- Hon, L. Q., Ganeshan, A., Thomas, S. M., Warakaulle, D., Jagdish, J., and Uberoi, R. 2009. Vascular closure devices: a comparative overview. *Curr.Probl.Diagn.Radiol.* 38.33-43.
- Huang, J. C., Ishida, M., Hersh, P., Sugino, I. K., and Zarbin, M. A. 1998. Preparation and transplantation of photoreceptor sheets. *Curr.Eye Res.* 17.573-85.
- Huhtala, A., Pohjonen, T., Salminen, L., Salminen, A., Kaarniranta, K., and Uusitalo, H. 2007. In vitro biocompatibility of degradable biopolymers in cell line cultures from various ocular tissues: direct contact studies. *J.Biomed.Mater.Res.A* 83.407-13.
- Huynh, T., Abraham, G., Murray, J., Brockbank, K., Hagen, P. O., and Sullivan, S. 1999. Remodeling of an acellular collagen graft into a physiologically responsive neovessel. *Nat.Biotechnol.* 17.1083-6.

- Imai, H., Honda, S., Kondo, N., Ishibashi, K., Tsukahara, Y., and Negi, A. 2007. The upregulation of angiogenic gene expression in cultured retinal pigment epithelial cells grown on type I collagen. *Curr.Eye Res.* 32.903-10.
- Ishikawa, N., Suzuki, Y., Dezawa, M., Kataoka, K., Ohta, M., Cho, H., and Ide, C. 2009. Peripheral nerve regeneration by transplantation of BMSC-derived Schwann cells as chitosan gel sponge scaffolds. *J.Biomed.Mater.Res.A* 89.1118-24.
- Issa, J. P., do, Nascimento C., Iyomasa, M. M., Siessere, S., Regalo, S. C., Defino, H. L., and Sebald, W. 2008. Bone healing process in critical-sized defects by rhBMP-2 using poloxamer gel and collagen sponge as carriers. *Micron.* 39.17-24.
- Itosaka, H., Kuroda, S., Shichinohe, H., Yasuda, H., Yano, S., Kamei, S., Kawamura, R., Hida, K., and Iwasaki, Y. 2009. Fibrin matrix provides a suitable scaffold for bone marrow stromal cells transplanted into injured spinal cord: a novel material for CNS tissue engineering. *Neuropathology.* 29.248-57.
- Jager, R. D., Mieler, W. F., and Miller, J. W. 2008. Age-related macular degeneration. *N.Engl.J.Med.* 358.2606-17.
- Jansen, R. G., Kuijpers-Jagtman, A. M., van Kuppevelt, T. H., and Von den Hoff, J. W. 2008. Collagen scaffolds implanted in the palatal mucosa. *J.Craniofac.Surg.* 19.599-608.
- Jehle, K. S. and Rohatgi, A. 2007. Use of porcine dermal collagen graft and topical negative pressure on infected open abdominal wounds. *J.Wound.Care* 16.36-7.
- Jonas, J. B., Libondi, T., Ihloff, A. K., Harder, B., Kreissig, I., Schlichtenbrede, F., Sauder, G., and Spandau, U. H. 2007. Visual acuity change after intravitreal bevacizumab for exudative age-related macular degeneration in relation to subfoveal membrane type. *Acta Ophthalmol.Scand.* 85.563-5.

- Joussen, A. M., Joeres, S., Fawzy, N., Heussen, F. M., Llacer, H., van Meurs, J. C., and Kirchhof, B. 2007. Autologous translocation of the choroid and retinal pigment epithelium in patients with geographic atrophy. *Ophthalmology* 114.551-60.
- Ju, Y. M., Yu, B., Koob, T. J., Moussy, Y., and Moussy, F. 2007. A novel porous collagen scaffold around an implantable biosensor for improving biocompatibility. I. In vitro/in vivo stability of the scaffold and in vitro sensitivity of the glucose sensor with scaffold. *J.Biomed.Mater.Res.A*.
- Khor, E. 1997. Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprotheses. *Biomaterials* 18.95-105.
- Khoshfetrat, A. B., Kino-Oka, M., Takezawa, Y., Yamamoto, T., Sugawara, K., and Taya, M. 2009. Seeding density modulates migration and morphology of rabbit chondrocytes cultured in collagen gels. *Biotechnol.Bioeng.* 102.294-302.
- Kiilgaard, J. F., Wiencke, A. K., Scherfig, E., Prause, J. U., and la Cour, M. 2002. Transplantation of allogenic anterior lens capsule to the subretinal space in pigs. *Acta Ophthalmol.Scand.* 80.76-81.
- Klein, E. M. and Bito, L. Z. 1983. Species variations in the pathophysiologic responses of vertebrate eyes to a chemical irritant, nitrogen mustard. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 24.184-91.
- Klein, R., Cruickshanks, K. J., Nash, S. D., Krantz, E. M., Javier, Nieto F., Huang, G. H., Pankow, J. S., and Klein, B. E. 2010. The prevalence of age-related macular degeneration and associated risk factors. *Arch.Ophthalmol.* 128.750-8.
- Koizumi, N., Sakamoto, Y., Okumura, N., Okahara, N., Tsuchiya, H., Torii, R., Cooper, L. J., Ban, Y., Tanioka, H., and Kinoshita, S. 2007. Cultivated corneal endothelial cell sheet transplantation in a primate model. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 48.4519-26.
- Kuroki, M., Voest, E. E., Amano, S., Beerepoot, L. V., Takashima, S., Tolentino, M., Kim, R. Y., Rohan, R. M., Colby, K. A., Yeo, K. T., and Adamis, A. P. 1996. Reactive oxygen intermediates

- increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *J.Clin.Invest* 98.1667-75.
- Kwak, N., Okamoto, N., Wood, J. M., and Campochiaro, P. A. 2000. VEGF is major stimulator in model of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 41.3158-64.
- Lee, C. J., Vroom, J. A., Fishman, H. A., and Bent, S. F. 2006. Determination of human lens capsule permeability and its feasibility as a replacement for Bruch's membrane. *Biomaterials* 27.1670-8.
- Lehmann, M. 1990. [Activity requirement for young domestic rabbits: raw fiber consumption and animal welfare]. *Schweiz.Arch.Tierheilkd.* 132.375-81.
- Liggett, P. E., Colina, J., Chaudhry, N. A., Tom, D., and Haffner, G. 2006. Triple therapy of intravitreal triamcinolone, photodynamic therapy, and pegaptanib sodium for choroidal neovascularization. *Am.J.Ophthalmol.* 142.1072-4.
- Liu, C. Z., Xia, Z. D., Han, Z. W., Hulley, P. A., Triffitt, J. T., and Czernuszka, J. T. 2007. Novel 3D collagen scaffolds fabricated by indirect printing technique for tissue engineering. *J.Biomed.Mater.Res.B Appl.Biomater.*
- Lu, J. T., Lee, C. J., Bent, S. F., Fishman, H. A., and Sabelman, E. E. 2007. Thin collagen film scaffolds for retinal epithelial cell culture. *Biomaterials* 28.1486-94.
- MacLaren, R. E., Uppal, G. S., Balaggan, K. S., Tufail, A., Munro, P. M., Milliken, A. B., Ali, R. R., Rubin, G. S., Aylward, G. W., and Da Cruz, L. 2007. Autologous transplantation of the retinal pigment epithelium and choroid in the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 114.561-70.
- Macular Photocoagulation Study Group. 1991. Laser photocoagulation of subfoveal neovascular lesions in age-related macular degeneration. Results of a randomized clinical trial. *Arch.Ophthalmol.* 109.1220-31.

- Macular Photocoagulation Study Group. 1994. Visual outcome after laser photocoagulation for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. The influence of initial lesion size and initial visual acuity. *Arch.Ophthalmol.* 112.480-8.
- Majji, A. B. and de Juan E Jr. 2000. Retinal pigment epithelial autotransplantation: morphological changes in retina and choroid. *Graefes Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.* 238.779-91.
- Marmor, M and T Wolfensberger. 1998. The retinal pigment epithelium. New York, Oxford: Oxford University Press.
- Mennel, S., Callizo, J., Schmidt, J. C., and Meyer, C. H. 2007. Acute retinal pigment epithelial tear in the untreated fellow eye following repeated bevacizumab (Avastin) injections. *Acta Ophthalmol.Scand.* 85.689-91.
- Mimura, T., Yamagami, S., Yokoo, S., Usui, T., Tanaka, K., Hattori, S., Irie, S., Miyata, K., Araie, M., and Amano, S. 2004. Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 45.2992-7.
- Miyamoto, N., de Kozak, Y., Normand, N., Courtois, Y., Jeanny, J. C., Benezra, D., and Behar-Cohen, F. 2008. PlGF-1 and VEGFR-1 pathway regulation of the external epithelial hemato-ocular barrier. A model for retinal edema. *Ophthalmic Res.* 40.203-7.
- Mruthyunjaya, P., Stinnett, S. S., and Toth, C. A. 2004. Change in visual function after macular translocation with 360 degrees retinectomy for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 111.1715-24.
- Nagineni, C. N., Samuel, W., Nagineni, S., Pardhasaradhi, K., Wiggert, B., Detrick, B., and Hooks, J. J. 2003. Transforming growth factor-beta induces expression of vascular endothelial growth factor in human retinal pigment epithelial cells: involvement of mitogen-activated protein kinases. *J.Cell Physiol* 197.453-62.

- Nakamura, T., Yoshitani, M., Rigby, H., Fullwood, N. J., Ito, W., Inatomi, T., Sotozono, C., Nakamura, T., Shimizu, Y., and Kinoshita, S. 2004. Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: a useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 45.93-9.
- Neeley, W. L., Redenti, S., Klassen, H., Tao, S., Desai, T., Young, M. J., and Langer, R. 2008. A microfabricated scaffold for retinal progenitor cell grafting. *Biomaterials* 29.418-26.
- Ng, K. W., Khor, H. L., and Hutmacher, D. W. 2004. In vitro characterization of natural and synthetic dermal matrices cultured with human dermal fibroblasts. *Biomaterials* 25.2807-18.
- Nicolini, J., Kiilgaard, J. F., Wiencke, A. K., Heegaard, S., Scherfig, E., Prause, J. U., and la Cour, M. 2000. The anterior lens capsule used as support material in RPE cell-transplantation. *Acta Ophthalmol.Scand.* 78.527-31.
- Oganesian, A., Gabrielian, K., Ernest, J. T., and Patel, S. C. 1999. A new model of retinal pigment epithelium transplantation with microspheres. *Arch.Ophthalmol.* 117.1192-200.
- Ogata, N., Wada, M., Otsuji, T., Jo, N., Tombran-Tink, J., and Matsumura, M. 2002. Expression of pigment epithelium-derived factor in normal adult rat eye and experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 43.1168-75.
- Ohno-Matsui, K., Ichinose, S., Nakahama, K., Yoshida, T., Kojima, A., Mochizuki, M., and Morita, I. 2005. The effects of amniotic membrane on retinal pigment epithelial cell differentiation. *Mol.Vis.* 11.1-10.
- Ohno-Matsui, K., Mori, K., Ichinose, S., Sato, T., Wang, J., Shimada, N., Kojima, A., Mochizuki, M., and Morita, I. 2006. In vitro and in vivo characterization of iris pigment epithelial cells cultured on amniotic membranes. *Mol.Vis.* 12.1022-32.
- Ophof, R., van Rheden, R. E., Von den, H. J., Schalkwijk, J., and Kuijpers-Jagtman, A. M. 2002. Oral keratinocytes cultured on dermal matrices form a mucosa-like tissue. *Biomaterials* 23.3741-8.

- Orwin, E. J. and Hubel, A. 2000. In vitro culture characteristics of corneal epithelial, endothelial, and keratocyte cells in a native collagen matrix. *Tissue Eng* 6.307-19.
- Oyster, C. W., Takahashi, E. S., and Hurst, D. C. 1981. Density, soma size, and regional distribution of rabbit retinal ganglion cells. *J.Neurosci.* 1.1331-46.
- Park, S. N., Park, J. C., Kim, H. O., Song, M. J., and Suh, H. 2002. Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking. *Biomaterials* 23.1205-12.
- Paskowitz, D. M., Greenberg, K. P., Yasumura, D., Grimm, D., Yang, H., Duncan, J. L., Kay, M. A., Lavail, M. M., Flannery, J. G., and Vollrath, D. 2007. Rapid and stable knockdown of an endogenous gene in retinal pigment epithelium. *Hum.Gene Ther.* 18.871-80.
- Pepper, M. S. 1997. Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 17.605-19.
- Petersen, J., Ritzau-Tondrow, U., and Hoerauf, H. 2008. [Autologous translocation of large retinal pigment epithelium choroid patches in age-related macular degeneration]. *Klin.Monatsbl.Augenheilkd.* 225.286-91.
- Presta, L. G., Chen, H., O'Connor, S. J., Chisholm, V., Meng, Y. G., Krummen, L., Winkler, M., and Ferrara, N. 1997. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res.* 57.4593-9.
- Punch, P. I., Costa, N. D., Edwards, M. E., and Wilcox, G. E. 1987. The release of insoluble antibiotics from collagen ocular inserts in vitro and their insertion into the conjunctival sac of cattle. *J.Vet.Pharmacol.Ther.* 10.37-42.
- Rizzolo, L. J. 1997. Polarity and the development of the outer blood-retinal barrier. *Histol.Histopathol.* 12.1057-67.

- Rosenfeld, P. J., Brown, D. M., Heier, J. S., Boyer, D. S., Kaiser, P. K., Chung, C. Y., and Kim, R. Y. 2006. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N.Engl.J.Med.* 355.1419-31.
- Rothamel, D., Schwarz, F., Stoldt, V., Herten, M., Kotthaus, C., and Becker, J. 2006. [In vitro testing of thrombocyte adhesion to different collagenous hemostyptic agents]. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 10.148-54.
- Rubin, A. L., Stenzel, K. H., Miyata, T., White, M. J., and Dunn, M. 1973. Collagen as a vehicle for drug delivery. Preliminary report. *J.Clin.Pharmacol.* 13.309-12.
- Samandari, M. H., Yaghmaei, M., Ejlali, M., Moshref, M., and Saffar, A. S. 2004. Use of amnion as a graft material in vestibuloplasty: a preliminary report. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 97.574-8.
- Sarkar, S. and Yong, V. W. 2009. Inflammatory cytokine modulation of matrix metalloproteinase expression and invasiveness of glioma cells in a 3-dimensional collagen matrix. *J.Neurooncol.* 91.157-64.
- Scheider, A., Gundisch, O., and Kampik, A. 1999. Surgical extraction of subfoveal choroidal new vessels and submacular haemorrhage in age-related macular degeneration: results of a prospective study. *Graefes Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.* 237.10-5.
- Schonleben, F., Reck, T., Tannapfel, A., Hohenberger, W., and Schneider, I. 2006. Collagen foil (TissuFoil E) reduces the formation of adhesions when using polypropylene mesh for the repair of experimental abdominal wall defects. *Int.J.Colorectal Dis.* 21.840-6.
- Schor, S. L. 1980. Cell proliferation and migration on collagen substrata in vitro. *J.Cell Sci.* 41.159-75.
- Schouten, J. S., La Heij, E. C., Webers, C. A., Lundqvist, I. J., and Hendrikse, F. 2009. A systematic review on the effect of bevacizumab in exudative age-related macular degeneration. *Graefes Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.* 247.1-11.

- Sheridan, C., Williams, R., and Grierson, I. 2004. Basement membranes and artificial substrates in cell transplantation. *Graefes Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.* 242.68-75.
- Singhal, S. and Vemuganti, G. K. 2005. Primary adult human retinal pigment epithelial cell cultures on human amniotic membranes. *Indian J.Ophthalmol.* 53.109-13.
- Stadler, K., Handler, J., Schoenkypl, S., and Walter, I. 2008. A three-dimensional culture model of canine uterine glands. *In Vitro Cell Dev.Biol.Anim.*
- Steinberg, R. H., Linsenmeier, R. A., and Griff, E. R. 1983. Three light-evoked responses of the retinal pigment epithelium. *Vision Res.* 23.1315-23.
- Steinberg, R. H. 1985. Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. *Doc.Ophthalmol.* 60.327-46.
- Strauss, O. 2005. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev.* 85.845-81.
- Takeda, A., Hata, Y., Shiose, S., Sassa, Y., Honda, M., Fujisawa, K., Sakamoto, T., and Ishibashi, T. 2003. Suppression of experimental choroidal neovascularization utilizing KDR selective receptor tyrosine kinase inhibitor. *Graefes Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.* 241.765-72.
- Takemoto, S., Morimoto, N., Kimura, Y., Taira, T., Kitagawa, T., Tomihata, K., Tabata, Y., and Suzuki, S. 2008. Preparation of collagen/gelatin sponge scaffold for sustained release of bFGF. *Tissue Eng Part A* 14.1629-38.
- Tao, S., Young, C., Redenti, S., Zhang, Y., Klassen, H., Desai, T., and Young, M. J. 2007. Survival, migration and differentiation of retinal progenitor cells transplanted on micro-machined poly(methyl methacrylate) scaffolds to the subretinal space. *Lab Chip.* 7.695-701.
- Tedder, M. E., Liao, J., Weed, B., Stabler, C., Zhang, H., Simionescu, A., and Simionescu, D. T. 2008. Stabilized Collagen Scaffolds for Heart Valve Tissue Engineering. *Tissue Eng Part A.*

- Tezcaner, A., Bugra, K., and Hasirci, V. 2003. Retinal pigment epithelium cell culture on surface modified poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) thin films. *Biomaterials* 24.4573-83.
- Tezcaner, A. and Hicks, D. 2008. In vitro characterization of micropatterned PLGA-PHBV8 blend films as temporary scaffolds for photoreceptor cells. *J.Biomed.Mater.Res.A* 86.170-81.
- Tezel, T. H., Del Priore, L. V., Berger, A. S., and Kaplan, H. J. 2007. Adult retinal pigment epithelial transplantation in exudative age-related macular degeneration. *Am.J.Ophthalmol.* 143.584-95.
- Thumann, G., Schraermeyer, U., Bartz-Schmidt, K. U., and Heimann, K. 1997. Descemet's membrane as membranous support in RPE/IPE transplantation. *Curr.Eye Res.* 16.1236-8.
- Thumann, G. and Kirchhof, B. 2004. [Transplantation of iris pigment epithelium]. *Ophthalmologe* 101.882-5.
- Thumann, G., Hueber, A., Dinslage, S., Schaefer, F., Yasukawa, T., Kirchhof, B., Yafai, Y., Eichler, W., Bringmann, A., and Wiedemann, P. 2006. Characteristics of iris and retinal pigment epithelial cells cultured on collagen type I membranes. *Curr.Eye Res.* 31.241-9.
- Thumann, G., Aisenbrey, S., Schaefer, F., and Bartz-Schmidt, K. U. 2006. Instrumentation and technique for delivery of tissue explants to the subretinal space. *Ophthalmologica* 220.170-3.
- Thumann, G., Viethen, A., Gaebler, A., Walter, P., Kaempfer, S., Johnen, S., and Salz, A. K. 2009. The in vitro and in vivo behaviour of retinal pigment epithelial cells cultured on ultrathin collagen membranes. *Biomaterials* 30.287-94.
- Tillman, B. W., Yazdani, S. K., Lee, S. J., Geary, R. L., Atala, A., and Yoo, J. J. 2009. The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction. *Biomaterials* 30.583-8.
- Tolentino, M. J., Brucker, A. J., Fosnot, J., Ying, G. S., Wu, I. H., Malik, G., Wan, S., and Reich, S. J. 2004. Intravitreal injection of vascular endothelial growth factor small interfering RNA inhibits

growth and leakage in a nonhuman primate, laser-induced model of choroidal neovascularization. *Retina* 24.660.

Treatment of age-related macular degeneration with photodynamic therapy (TAP) Study Group. 1999. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: one-year results of 2 randomized clinical trials--TAP report. *Arch.Ophthalmol.* 117.1329-45.

Treumer, F., Klatt, C., and Roider, J. 2007. [Autologous RPE-choroid translocation in exudative AMD. A case series of 10 consecutive patients]. *Ophthalmologe* 104.795-802.

Tsukahara, I., Ninomiya, S., Castellarin, A., Yagi, F., Sugino, I. K., and Zarbin, M. A. 2002. Early attachment of uncultured retinal pigment epithelium from aged donors onto Bruch's membrane explants. *Exp.Eye Res.* 74.255-66.

Tucker, B. A., Redenti, S. M., Jiang, C., Swift, J. S., Klassen, H. J., Smith, M. E., Wnek, G. E., and Young, M. J. 2010. The use of progenitor cell/biodegradable MMP2-PLGA polymer constructs to enhance cellular integration and retinal repopulation. *Biomaterials* 31.9-19.

Turowski, P., Adamson, P., Sathia, J., Zhang, J. J., Moss, S. E., Aylward, G. W., Hayes, M. J., Kanuga, N., and Greenwood, J. 2004. Basement membrane-dependent modification of phenotype and gene expression in human retinal pigment epithelial ARPE-19 cells. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 45.2786-94.

van Soest, S. S., de Wit, G. M., Essing, A. H., ten Brink, J. B., Kamphuis, W., de Jong, P. T., and Bergen, A. A. 2007. Comparison of human retinal pigment epithelium gene expression in macula and periphery highlights potential topographic differences in Bruch's membrane. *Mol.Vis.* 13.1608-17.

van Tienen, T. G., Hannink, G., and Buma, P. 2009. Meniscus replacement using synthetic materials. *Clin.Sports Med.* 28.143-56.

- Vedula, S. S. and Krzystolik, M. G. 2008. Antiangiogenic therapy with anti-vascular endothelial growth factor modalities for neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* CD005139.
- Vingerling, J. R., Dielemans, I., Hofman, A., Grobbee, D. E., Hijmering, M., Kramer, C. F., and de Jong, P. T. 1995. The prevalence of age-related maculopathy in the Rotterdam Study. *Ophthalmology* 102.205-10.
- Wahl, D. A., Sachlos, E., Liu, C., and Czernuszka, J. T. 2007. Controlling the processing of collagen-hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *J.Mater.Sci.Mater.Med.* 18.201-9.
- Wakitani, S., Nawata, M., Tensho, K., Okabe, T., Machida, H., and Ohgushi, H. 2007. Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees. *J.Tissue Eng Regen.Med.* 1.74-9.
- Wang, F., Rendahl, K. G., Manning, W. C., Quiroz, D., Coyne, M., and Miller, S. S. 2003. AAV-mediated expression of vascular endothelial growth factor induces choroidal neovascularization in rat. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 44.781-90.
- Wang, H., Ninomiya, Y., Sugino, I. K., and Zarbin, M. A. 2003. Retinal pigment epithelium wound healing in human Bruch's membrane explants. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 44.2199-210.
- Wang, H., Van Patten, Y., Sugino, I. K., and Zarbin, M. A. 2006. Migration and proliferation of retinal pigment epithelium on extracellular matrix ligands. *J.Rehabil.Res.Dev.* 43.713-22.
- Wanke, M., Grozinger, K. H., and Hartmann, R. 1966. [Covering of extensive surface skin defects with a new 3-layered collagen foil]. *Langenbecks Arch.Chir* 314.99-116.
- Williams, R. L., Krishna, Y., Dixon, S., Haridas, A., Grierson, I., and Sheridan, C. 2005. Polyurethanes as potential substrates for sub-retinal retinal pigment epithelial cell transplantation. *J.Mater.Sci.Mater.Med.* 16.1087-92.

- Witmer, A. N., Vrensen, G. F., Van Noorden, C. J., and Schlingemann, R. O. 2003. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog.Retin.Eye Res.* 22.1-29.
- Wong, R. W. and Rabie, A. B. 2006. Effect of naringin collagen graft on bone formation. *Biomaterials* 27.1824-31.
- Wongpichedchai, S., Weiter, J. J., Weber, P., and Dorey, C. K. 1992. Comparison of external and internal approaches for transplantation of autologous retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 33.3341-52.
- Yaji, N., Yamato, M., Yang, J., Okano, T., and Hori, S. 2008. Transplantation of tissue-engineered retinal pigment epithelial cell sheets in a rabbit model. *Biomaterials*.
- Yaji, N., Yamato, M., Yang, J., Okano, T., and Hori, S. 2009. Transplantation of tissue-engineered retinal pigment epithelial cell sheets in a rabbit model. *Biomaterials* 30.797-803.
- Yow, S. Z., Quek, C. H., Yim, E. K., Lim, C. T., and Leong, K. W. 2008. Collagen-based fibrous scaffold for spatial organization of encapsulated and seeded human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*.
- Zarbin, M. A. 2003. Analysis of retinal pigment epithelium integrin expression and adhesion to aged submacular human Bruch's membrane. *Trans.Am.Ophthalmol.Soc.* 101.499-520.
- Zarbin, M. A. 2004. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Arch.Ophthalmol.* 122.598-614.
- Zou, T., Yan, J., Fu, H., Hou, Z., Wang, S., and Xia, J. 2005. [Combined use of autologous micromorselized bone with bone morphogenetic protein and type I collagen graft in repairing rabbit bone defects]. *Zhongguo Xiu.Fu Chong.Jian.Wai Ke.Za Zhi.* 19.187-91.

DANKSAGUNG

Mein bester Dank gilt Frau Univ.-Prof. Dr. med. Gabriele Thumann für das sehr interessante Thema und die exzellente Betreuung, sowohl in der experimentellen Phase als auch beim Erstellen dieser Arbeit. Die Operation der Kaninchenaugen wurde von Frau Univ.-Prof. Dr. med. Gabriele Thumann durchgeführt.

Frau Anja Viethen möchte ich für die Einführung in allen mir zugedachten Arbeitsgebieten danken.

Frau Dipl.-Biologin Anna Katharina Salz danke ich für die Zellbesiedelung der Kollagenfolien.

Bei Frau Corinna Kailuweit möchte ich mich für die Narkotisierung der Tiere bedanken.

Meiner ehemaligen Teamkollegin und Freundin, Frau Dr. Stefanie Kämpf danke ich für die wertvollen Ratschläge und unermüdliche Motivation zum Schreiben dieser Arbeit.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe-Thumann möchte ich mich für die sehr angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei dem Team der Versuchstierkunde für die Haltung und Pflege der Kaninchen.

Mein großer Dank gilt auch meinem lieben Ehemann, der mich stets moralisch unterstützt hat.

ERKLÄRUNG § 5 ABS. 1 ZUR DATENAUFBEWAHRUNG

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten

bei meiner Betreuerin, ***Univ.- Prof. Dr. med. Gabriele Thumann, Klinik für Augenheilkunde*** des Universitätsklinikums Aachen,

hinterlegt sind.

LEBENS LAUF

Zu meiner Person

Name:	Frank , geb. Perera
Vorname:	Uswatta Liyanage Dilini Chrischon Madhurangi
Adresse:	Rosentalstraße 7 52222 Stolberg
Telefon:	0176 63152245
E-Mail:	dfrank@ukaachen.de
Familienstand:	verheiratet

Schulbildung

1983 -1985	Grundschule, Katuneriya, Sri Lanka
1986 - 1988	Holy Family Convent, Wennappuwa, Sri Lanka
1989 - 1993	Wiestorschule Überlingen Hauptschulabschluss
1993 - 1995	Constantin-Vanotti-Schule Überlingen Wirtschaftsschule Fachschulreife
1995 - 1999	Constantin-Vanotti-Schule Überlingen Wirtschaftsgymnasium Allgemeine Hochschulreife (Jahrgangsbeste)

Studium

WS 99/00 - 08	Medizinstudium an der RWTH-Aachen
Frühjahr 2004	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01.2007 - 08.2007	Experimentelle Doktorarbeit IZKF „BIOMAT“ / Augenheilkunde Universitätsklinikum Aachen
08.2007 - 07.2008	Praktisches Jahr im Bethlehemkrankenhaus Stolberg, Wahlfach: Pädiatrie
Herbst 2008	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

23.08. - 21.09.2004	Chirurgie, Krankenhaus Stockach
28.02. - 14.03.2006	Allgemeinmedizin, Praxis, Stockach
16.03. - 30.03.2006	Allgemeinmedizin, Praxis, Aachen
24.07. - 22.08.2006	Pädiatrie, Universitätsklinikum Aachen
04.09. - 18.09.2006	Pädiatrie, Bethlehem Krankenhaus Stolberg
25.09. - 09.10.2006	Anästhesie, Krankenhaus Stockach

Berufstätigkeit

03.2009 -	Assistenzärztin, Klinik für Strahlentherapie, Universitätsklinikum Aachen
-----------	---

Sprachen

Englisch	Fließend, in Wort und Schrift
Singhalesisch	Fließend, in Wort und Schrift
Französisch	Grundkenntnisse

EDV-Kenntnisse

Gute Kenntnisse im Umgang mit Windowsbetriebssystemen ab Windows95

Textverarbeitung, Dokumentbearbeitung (Microsoft Word, Adobe Acrobat)

Microsoft Excel, Microsoft PowerPoint, Reference Manager

Maschinenschreiben (>200 Anschläge pro Minute)

Aachen, 28.04.2011

Dilini Frank
