

Aus der Klinik für Ophthalmologie
(Direktor: Prof. Dr. med. J. Roider)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**RPE-CHORIOIDEA TRANSPLANTATION BEI ALTERSBEDINGTER
MAKULADEGENERATION.**
UNTERSUCHUNGEN ZUR PLASMASKALPELL-GESTÜTZTEN ABTRAGUNG VON
CHORIOIDEA AM SCHWEINEBULBUS.

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
BENJAMIN ERICH DOMINIK SATTLER
aus Bonn

Kiel 2009

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Roider

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. Wiltfang

Tag der mündlichen Prüfung:

5. Oktober 2009

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

5. Oktober 2009

gez.: Prof. Dr. Acil

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

meiner Mãe,
in Gedenken an meinen Vater

1. Einleitung	1
1.1. Das Krankheitsbild der altersbedingten Makuladegeneration (AMD).....	1
1.2. Anatomie des Auges.....	2
1.2.1. Bulbus.....	2
1.2.2. Retina.....	2
1.2.3. Stratum Pigmentosum.....	3
1.2.4. Stratum Nervosum.....	3
1.3. Aktuelle Therapieverfahren bei altersbedingter Makuladegeneration.....	4
1.4. Fragestellung der durchgeführten Untersuchungen.....	6
2. Methoden	7
2.1. Plasmaskalpelle Zeiss PEAK (Pulsed Electron Avalanche Knife) - FC.....	7
2.2. Abtragung chorioidalen Gewebes mit dem PEAK-FC Plasmaskalpelle.....	9
2.3. Rasterelektronenmikroskopie.....	9
2.3.1. Aufbau und Funktion des Rasterelektronenmikroskops.....	9
2.3.2. Fixierung und Entwässerung des Präparats für das REM.....	11
2.3.3. Bepatterungsvorgang.....	11
2.3.4. Verfahren am Rasterelektronenmikroskop.....	12
2.4. Histologie.....	13
2.4.1. Herstellung des histologischen Präparats.....	13
2.4.2. Histologische Auswertung.....	14
2.5. Festlegung der zu untersuchenden Parameter.....	15
3. Ergebnisse	16
3.1. Ergebnisse der Wirkung des Parameters Amplitude.....	16
3.2. Ergebnisse der Wirkung des Parameters Abstand.....	18
3.3. Ergebnisse der Wirkung des Parameters Dauer.....	19
3.4. Beurteilung von Kollateralschäden im histologischen Schnitt.....	21
3.5. Ergebnisse der Rasterelektronen Mikroskopie.....	23
3.6. Visuelle Kontrolle der Abtragungstiefe.....	25
4. Diskussion	28
5. Zusammenfassung	32
6. Literaturverzeichnis	34
7. Danksagung	40
8. Lebenslauf	41

1. Einleitung

1.1. Das Krankheitsbild der altersbedingten Makuladegeneration (AMD)

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist die häufigste Erblindungsursache der Bevölkerung über dem 50. Lebensjahr in den westlichen Industrienationen. (Bird 1996, Bressler et al. 1995, Hyman et al. 1983, Klaver et al. 2003, Holz et al. 1997). Die Symptomatik dieser chronisch progredient verlaufenden Erkrankung reicht von einer leichten Visusminderung bis zum vollständigen Verlust der zentralen Sehschärfe und Lesefähigkeit im fortgeschrittenen Stadium. Die betroffenen Patienten können sich im Alltag nicht mehr ausreichend selbst versorgen und leiden an einer starken Einschränkung der Lebensqualität (Brody et al. 2002, Wovner et al. 2002, Trauzettel-Klosinski et al. 2003, Holz et al. 1997).

Es werden zwei klinische Formen der altersbedingten Makuladegeneration unterschieden. Die nicht exsudative (trockene) AMD und die exsudative Form der AMD. Bei der nicht exsudativen AMD kommt es zu einer langsamen Degeneration des retinalen Pigmentepithels (RPE) und der Choriokapillaris mit konsekutivem Zelltod der retinalen Photorezeptoren (Eagle et al. 1984). Die genauen Ursachen für den Untergang des RPE sind nicht bekannt. Diskutiert wird eine multifaktorielle genetische Disposition (Scholl et al. 2007). Möglicherweise fördert auch die im Laufe des Lebens kumulativ starke Lichtbelastung der Makula mit photochemischer Entstehung toxischer Radikale die Schädigung des RPE (Grehn et al. 2002).

Bei der exsudativen Form der Makuladegeneration kommt es zur Ausbildung von Neovaskularisationen in der Chorioidea. Diese können die Bruch-Membran durchbrechen und in das RPE sowie die Netzhaut einsprossen und diese zerstören (Abb. 1). Es werden verschiedene Ursachen für die Einsprossung der Gefäße aus der Choriokapillaris vermutet. So werden poröse Schädigungen der Bruch-Membran durch kumulierende Stoffwechselprodukte am angrenzenden Pigmentepithel diskutiert. Auch eine Verdickung der alternden Bruch-Membran kann durch einen verminderten Sauerstoff- und Nährstofftransport aus der Choriokapillaris zu einer Hypoxie des RPE und der äußeren Netzhautschichten führen. (Penfold et al. 1985, Young et al. 1987). Durch Produktion angiogenetischer Faktoren in den RPE-Zellen kann es zu einer Verschiebung der physiologischen Balance zwischen anti-angiogenetischen und angiogenetischen Faktoren kommen, welche zur Migration und

Proliferation von chorioidalen Endothelzellen führt. Eine Rolle bei der Stimulation vaskulärer Proliferation spielt u.a. der Wachstumsfaktor VEGF („vascular endothelial growth factor“), der auch in den RPE-Zellen gebildet werden kann (Holz et al. 1997). Die neugebildeten chorioidalen Gefäße durchdringen die Bruch-Membran und breiten sich meist unterhalb der Makula aus. Die zarten Endothelien dieser Neovaskularisationen zeigen Leckagen mit Austritt von Serum-Flüssigkeit und Blutungen in und unter die Netzhaut. Dieser Prozeß endet schließlich mit Verlust der neuronalen retinalen Strukturen in einem narbig fibrösen Umbau der Makula. Damit ist das Endstadium der exsudativen Makuladegeneration erreicht und der Patient leidet an einem irreversiblen Verlust der zentralen Sehschärfe.

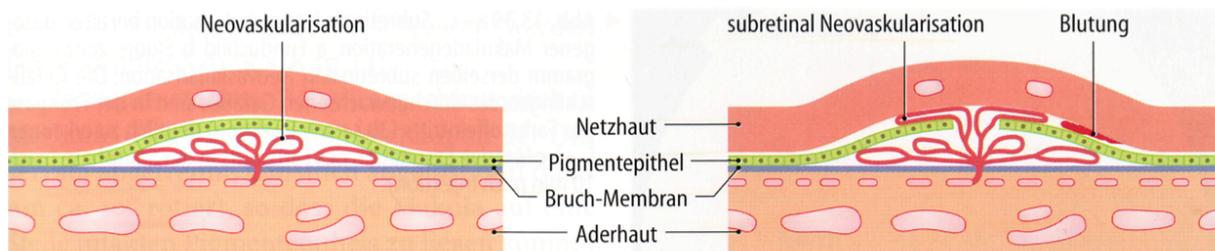


Abbildung 1: Schematische Darstellung der subretinalen Neovaskularisation bei AMD (aus Augenheilkunde Grehn 2002, mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlags).

1.2. Anatomie des Auges

1.2.1. Bulbus

Der Augapfel ist nahezu kugelförmig und hat einen äußeren Radius von ca. 24 mm (Putz et al. 2000). Die Wand des Bulbus hat drei Schichten, die weiter unterteilt werden können: Tunica Fibrosa, mit dem vorderen, transparenten Anteil Cornea (Hornhaut) und dem hinteren weißlichen Anteil Sclera (Lederhaut). Tunica Vasculosa (Uvea), mit den Anteilen Iris, Ziliarkörper und Chorioidea (Aderhaut). Tunica Interna (Retina), mit dem sehenden Anteil der Pars optica retinae und dem blinden Anteil Pars caeca retinae (Putz, Pabst 2000)

1.2.2. Retina

Die Retina besteht aus zwei Schichten, dem Stratum pigmentosum und dem Stratum nervosum. Inneres und äußeres Blatt der Netzhaut sind neuroektodermaler Genese, (Schiebler und Schmidt 2002) und somit als vorgelagerte Hirnanteile zu sehen. Die Retina wird von zwei Seiten vaskulär versorgt. Mit dem N. opticus tritt die A. centralis retinae in die Netzhaut und versorgt das Stratum nervosum retinae von der Innenseite des Bulbus. Die Äste der A. centralis retinae sind Endarterien. Ihre Kapillaren dringen bis zur inneren Körnerschicht vor. Von der Außenseite des Bulbus werden die Sinneszellen zusätzlich aus den Gefäßen der Chorioidea ernährt. (Leonhardt 1990) Jedoch ziehen die Gefäße nicht durch die Netzhaut hindurch, sodass Anteile nur durch Diffusion Anschluss an den Blutkreislauf finden. Bei dem Metabolismus des stratum nervosum spielt das Pigmentepithel eine wichtige Rolle.

1.2.3. Stratum Pigmentosum

Das Stratum Pigmentosum ist ein mehrschichtiges Epithel und sitzt der Bruch-Membran fest auf. (Leonhardt 1990) Über die Bruch-Membran ist es mit der Chorioidea verbunden. Die in den Pigmentepithelzellen eingelagerten Melaningranula sind für die makroskopisch sichtbare dunkle Verfärbung verantwortlich. Sie dienen unter anderem der Lichtabsorption zur Vermeidung von Streulicht innerhalb der Netzhaut. Und verbessern dadurch die Bildauflösung und Sehschärfe. (Schiebler und Schmidt 2002). Die Phagolysosomen in der Pigmentepithelzellen sind maßgeblich am Abbau und Recycling der Stäbchenzellen und deren Stoffwechselprodukte beteiligt (Leonhardt 1990). So phagozytiert eine Pigmentepithelzelle täglich ca. 200.000 abgestoßene Scheibchen der Rezeptoraußensegmente (Grehn 2002). Da die Gefäße der arteria centralis retinae nur bis zur inneren Körnerschicht reichen, erfolgt außerdem die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung der äußeren Netzhautschichten aus der Choriokapillaris per Diffusion und aktiven Transport über das retinale Pigmentepithel.

1.2.4. Stratum Nervosum

Das Stratum Nervosum kann in neun Schichten eingeteilt werden, die von eindringendem Licht durchstrahlt werden bis es auf die Photorezeptoren trifft. Das eintreffende Licht wird in den Zapfen und Stäbchen in elektrische Reize umgewandelt. Die Reize werden von dort aus afferent über die Sehbahn in entgegengesetzter Richtung zum einfallenden Licht zur Großhirnrinde weitergeleitet.

1.3. Aktuelle Therapieverfahren bei altersbedingter Makuladegeneration

Die heutigen Behandlungsoptionen der exsudativen AMD umfassen die konventionelle Laserkoagulation, die Photodynamische Therapie und seit kurzem die intravitreale Blockade von VEGF (Rosenfeld et al. 2006, Chakravarthy et al. 2006). Die Laserkoagulation der CNV führt zur Verödung der Gefäße durch Erhitzung. Diese Behandlung ist nur möglich bei exzentrisch gelegenen chorioidalen Neovaskularisationen, da dabei auch das RPE und die neuronale Netzhaut zerstört werden. Eine Behandlung subfoveal gelegener CNVs würde daher mit einem Verlust der zentralen Sehschärfe einhergehen. Eine Alternative stellt die Photodynamische Therapie (PDT) dar. Hier wird ein Farbstoff verabreicht, der sich selektiv in den subfovealen chorioidalen Neovaskularisationen anreichert. Nach Anregung mit einem Laser entstehen dann phototoxische Radikale, welche zu einer Photothrombose der CNV führt. Die Behandlung geht mit einer hohen Rezidivrate einher und führt zu einer Atrophie des RPE. Die Behandlung mit intravitreal applizierten anti-VEGF Medikamenten (Ranibizumab, Bevacizumab) ist heute das Standardverfahren in der Behandlung der exsudativen AMD. Die intravitreale Injektion dieser Präparate muss jedoch in der Regel mehrmals pro Jahr durchgeführt werden. Patienten, bei denen diese Medikamente das Wachstum der CNV nicht hemmen können (Therapieversager) und Patienten bei denen es zu großen subretinalen Blutungen oder Einrissen des RPE im Verlauf der AMD kommt leiden unter der unaufhaltsamen Progression der Erkrankung mit irreversiblen Verlust der zentralen Sehschärfe.

Allen genannten Strategien ist gemeinsam, dass sie nur den Verlauf der Erkrankung modulieren, nicht aber die pathologisch veränderte RPE-Chorioidea Schicht als zugrundeliegende Pathologie selbst angehen. Dagegen könnte die chirurgische Extraktion der

chorioidalen Neovaskularisation (CNV) eine potentiell kurative Behandlungsmöglichkeit der exsudativen AMD darstellen. Jedoch geht das alleinige Entfernen der CNV Membran mit einer irreversiblen Beschädigung des RPE, der Bruchmembran und der Choriokapillaris einher. Konsekutiv degenerieren die fovealen Photorezeptoren, wodurch eine postoperative Visusrehabilitation in der Regel nicht zu erwarten ist (Eckardt et al. 1996, Gass et al. 1994, Hawkins et al. 2004, Thomas et al. 1994). Die klinischen Ergebnisse der Makula-Rotationschirurgie, bei der die zentrale Netzhaut auf gesundes, paramakulär gelegenes RPE rotiert wird, haben gezeigt, dass extrafoveales RPE die Funktion der fovealen Photorezeptoren unterstützen kann (Aisenbrey et al. 2002, Eckardt et al. 1999). Jedoch hat sich dieses komplexe Verfahren aufgrund der hohen Komplikationsrate (PVR, Diplopie, Makulaödem) nicht durchsetzen können.

Ein anderer Ansatz, die Funktion der fovealen Photorezeptoren zu erhalten, ist die Translokation von „gesundem“ RPE unter die foveale Netzhaut. Die subretinale Transplantation von allogenen RPE-Transplantaten führte jedoch zu Immunreaktionen mit subretinaler Fibrose und es zeigte sich keine substantielle Visusverbesserung (Algvere et al. 1994, Algvere et al. 2006). Auch die subretinale Injektion von autologen RPE-Zellsuspensionen oder Irispigmentepithelzellen konnte den postoperativen Visus nicht signifikant verbessern, da die Ausbildung eines einschichtigen RPE-Zellrasens nicht gelang und die Adhärenz und Polarisierung der injizierten Zellen auf der beschädigten Bruchmembran unklar blieb (Lappas et al. 2004, van Meurs et al. 2004).

Die subfoveale Translokation eines autologen RPE-Chorioidea Zellverbandes (RPE-„Patch“ oder „Sheet“) wurde erstmals von Peyman et al. in einem Fallbericht beschrieben (Peyman et al. 1991). Inzwischen konnte in weiteren Fallserien gezeigt werden, dass dieses Operationsverfahren vergleichsweise komplikationsarm durchführbar ist und postoperativ eine retinale Lichtempfindlichkeit und Fixation auf dem Translokat möglich ist (Joussen et al. 2006, Stanga et al. 2002, van Meurs et al. 2003, Treumer et al. 2007). Bei dieser Operationstechnik erfolgt nach der Vitrektomie die subretinale Extraktion der chorioidalen Neovaskularisation (CNV) durch eine Retinotomie im Bereich des oberen temporalen Gefäßbogens. Dann wird in der superioren, mittleren Peripherie ein zwei bis drei Papillendurchmesser großes Netzhautareal kreisförmig mit kräftig-weißen Endolaserkoagulationsherden (grüner Nd-YAG-Laser, 500ms) zweireihig umstellt. Innerhalb

dieses Kreises wird die neurosensorische Netzhaut mittels einer Teflonkanüle mit BSS (balanced salt solution) unterspritzt und abgehoben. Nach Entfernung der Netzhaut mittels Vitrektom erfolgt eine Exzision von RPE und oberflächiger Chorioidea. Die RPE-Chorioidea Schicht wird mit einer Pinzette gefasst und mit speziell entwickelten Scherchen herauspräpariert. Durch die Retinotomie wird das RPE-Chorioidea Translokate nach subretinal transloziert und möglichst zentral positioniert

1.4. Fragestellung der durchgeführten Untersuchungen

Das Transplantat besteht bei der autologen RPE-Sheet Translokation immer aus drei Anteilen: Dem einschichtigen retinalen Pigmentepithel, der Bruch-Membran und der Choriokapillaris bzw. Chorioidea. Diese drei Anteile sind mit einander verwachsen und können daher nicht einzeln entnommen werden. Aus der Dicke der subretinalen Chorioideaschicht des Transplantats ergeben sich jedoch Probleme: Zum einen resultiert aus der Dicke eine gewisse Vorwölbung der Netzhaut in den Glaskörperraum, die zu einer Verformung der Photorezeptorschicht führt. Diese kann vom Patienten als Verzerrung des Bildeindruckes wahrgenommen werden. Zum anderen erschwert die unphysiologisch dicke Aderhautschicht ein passgenaues Einheilen des Translokates und es ist vorstellbar, dass die nutritive Versorgung der RPE-Zellen aus der Aderhaut durch ein voluminöses Präparat erschwert wird. Nach der Translokation erfolgt die nutritive Versorgung der RPE-Zellen und der neurosensorischen Netzhaut bis zur Vaskularisation des Translokates durch Diffusion aus der tiefliegenden Aderhaut des Empfängerbettes. Durch eine voluminöse Chorioideaschicht wird dieser Nährstofftransport erschwert. Zur Veranschaulichung zeigt die Abbildung 2 einen OCT (Optische Kohärenz Tomographie)-Scan der Makularegion nach erfolgter RPE-Chorioidea Translokation ohne eine chirurgische Chorioidea-Ausdünnung des Translokates. Zu erkennen ist eine deutliche Vorwölbung des Translokates in Richtung Glaskörperraum mit einer unregelmäßig gewellten RPE-Schicht und deutlich verdickter Chorioidea.

Es wäre also wünschenswert, die Dicke des RPE-Chorioidea Translokates intraoperativ zu reduzieren, um in den Subretinalraum tatsächlich nur ein Transplantat bestehend aus einschichtigem RPE-Zellrasen, Bruch-Membran und einer dünnen Choriokapillaris zu transplantieren.

Ziel der Arbeit war es daher, zu untersuchen, ob es mit einem Plasmaskalpelli möglich ist, die Chorioidea mikrochirurgisch exakt und reproduzierbar zu abladieren, ohne die angrenzenden sensiblen Strukturen der Bruchmembran und des RPE zu beschädigen.

Hierfür wurden aus enukleierten Schweineaugen RPE-Chorioidea-Sheets präpariert. Diese wurden mit der chorioidalen Seite nach oben auf ein Mikrofasertuch genäht und mit einem Plasmaskalpelli abgetragen. Die so behandelten RPE-Chorioidea-Sheets wurden histologisch und elektronenmikroskopisch aufgearbeitet und mittels digitaler Bildverarbeitung exakt vermessen und die gewonnenen Daten statistisch ausgewertet.

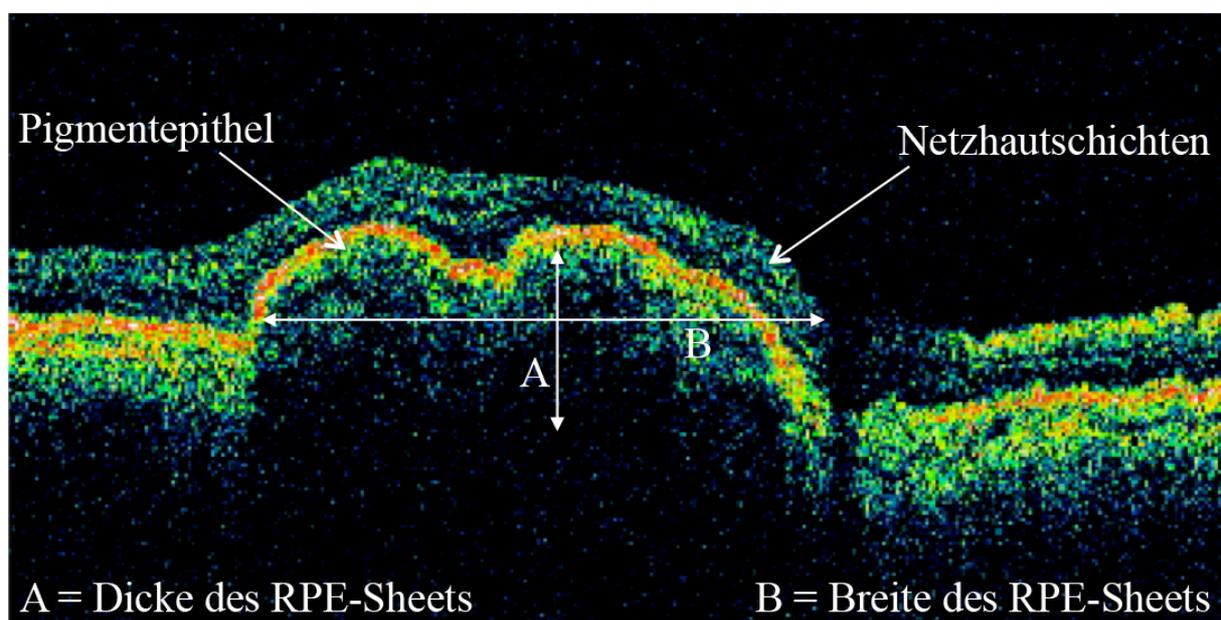


Abbildung 2: Optische Kohärenz Tomographie (OCT) der Makula nach RPE-Chorioidea-Translokation ohne chirurgische Chorioidea-Ausdünnung. Zu erkennen ist das voluminös vorgewölbte Translokate (RPE-Sheet) mit welliger Oberfläche.

2. Methoden

2.1. Plasmaskalpelli Zeiss PEAK (Pulsed Electron Avalanche Knife) - FC

Das Prinzip dieses Instruments basiert auf der Bildung eines Plasmas um eine Mikroelektrode in einem flüssigen Medium. Innerhalb der Plasmazone kommt es zu einer schnellen Evaporisierung des Gewebes. Das Plasma formt sich in Flüssigkeit ab einer Feldstärke von

106 V/cm und einer entladenen Energie von 1 kJ/cm³. Es kommt zu einer explosionsartigen Verdampfung und Ionisierung des flüssigen Mediums. Angrenzendes Gewebe wird hierdurch zerstört und sammelt sich als Dampf in Bläschen. Das evaporisierte Material kühlt innerhalb von Millisekunden ab, so dass es zu keiner thermischen Belastung mit Kollateralschäden des benachbarten Gewebes kommt. Der physikalische Effekt ist ähnlich dem eines Nd:YAG Lasers, der in der Augenheilkunde für verschiedene Indikationen, wie z.B. der Kapsulotomie nach Implantation einer künstlichen Intraokularlinse, etabliert ist. Auch der Nd:YAG Laser formt ein Plasma ähnlicher Größe. Hierbei wird das Plasma jedoch optisch erzeugt durch einen sehr kleinen Fokus des Infrarotstrahls. Das PEAK-FC erzeugt das Plasma hingegen durch eine schnelle elektrische Entladung. Während der Nd:YAG Laser für einzelne Schüsse eingesetzt wird, kann das PEAK-FC mit einer Wiederholungsrate von bis zu 100 Hz eine konstante Abtragung des Gewebes erreichen. Es erlaubt somit nicht nur Löcher in das Gewebe zu setzen, sondern Gewebe zu zerschneiden ähnlich einem Skalpell. Um ein Plasma zu erzeugen, das klein genug ist, um mikrochirurgisch genutzt werden zu können, hat das PEAK eine im Durchmesser nur 50µm messende Elektrode. Die hochvoltigen Impulse können durch die Parameter Pulsweite, Pulse pro Stoß, Wiederholungsrate und Amplitude der Spannung (Justierung am Hauptgerät in %) genau eingestellt werden, sodass die Wirkungsstärke dem jeweiligen Gewebe angepasst werden kann. Abbildung 3 zeigt schematisch die Funktionsparameter des Plasmaskalpells.

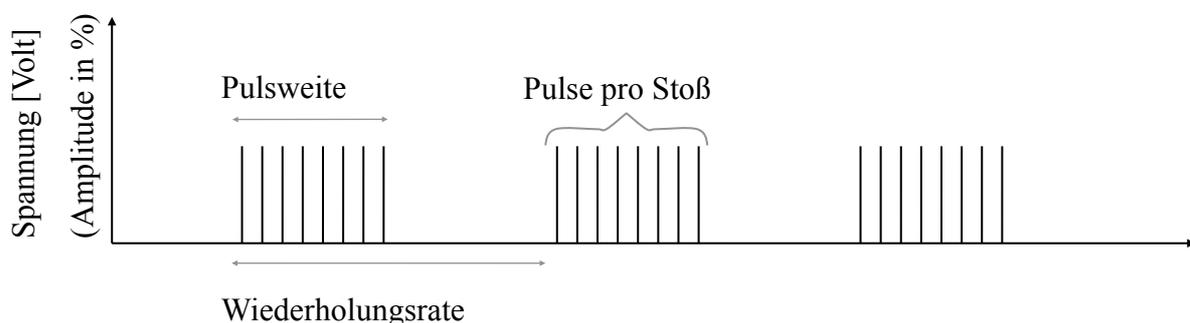


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Funktionsparameter des Plasmaskalpells, die am Steuergerät verändert werden können: Pulsweite [Sekunden]; Pulse pro Stoß [Anzahl]; Wiederholungsrate [Hz]; Amplitude der Spannung [Einstellung in %].

2.2. Abtragung chorioidalen Gewebes mit dem PEAK-FC Plasmaskalpell

Zunächst wurde von frisch enukleierten Schweineaugen ein Transplantat bestehend aus RPE, Bruch-Membran und Chorioidea gewonnen (die E nukleation erfolgte direkt nach Eintritt des Todes, die Weiterverarbeitung 45-90 Minuten nach E nukleation). Hierzu wurde die Cornea, Linse und Iris mit einem zirkulären Schnitt 5mm posterior des Limbus exzidiert. Der Glaskörper und die Netzhaut wurden vorsichtig abgelöst und nach außen geklappt ohne das Pigmentepithel zu verletzen. Das nun freiliegende RPE wurde als Block mit einer Kantenlänge von ca. 5mm zusammen mit der darunter liegenden Bruch-Membran und der Chorioidea mittels Skalpell ausgeschnitten. Das so gewonnene Transplantat wurde RPE-seitig auf ein Mikrofasertuch (Typ: extralight, Maratuff, Eckernförde, Deutschland) genäht, in isotoner Kochsalzlösung auf einem Korkbett fixiert und unter einem Operationsmikroskop (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) mit dem Plasmaskalpell bearbeitet. Mit dem Zeiss PEAK-FC wurden an dem Gewebe mehrere Applikationen unterschiedlicher Dosis und Länge und mit unterschiedlichem Abstand zum Gewebe angewendet. Dabei war die Spitze des Plasmaskalpells in einen Mikromanipulator fixiert, welcher es zuließ, den Abstand zum Gewebe bis auf ein 0,1mm genau zu dosieren. Um die jeweiligen Applikationen zuordnen zu können wurden nur jeweils die Ecken des Transplantats bearbeitet. Für eine eindeutige Orientierung wurden die Applikationsareale mit einer Markerfarbe (WAK-Chemie Medical GmbH, Bad Homburg, Deutschland) gefärbt und in einer Skizze festgehalten.

2.3. Rasterelektronenmikroskopie

2.3.1. Aufbau und Funktion des Rasterelektronenmikroskops

Das Rasterelektronenmikroskop (REM) eignet sich zur Darstellung dreidimensionaler Oberflächen von Geweben, Zellen, aber auch Zellbestandteilen. In der Bildausgabe erhält man eine sehr gute Wiedergabe von Konturen, Strukturen und der Plastizität einer Oberfläche mit einer hohen Tiefenschärfe. Nicht wiedergegeben werden Strukturen, die z.B. im Zellinneren oder unterhalb einer Oberfläche liegen.

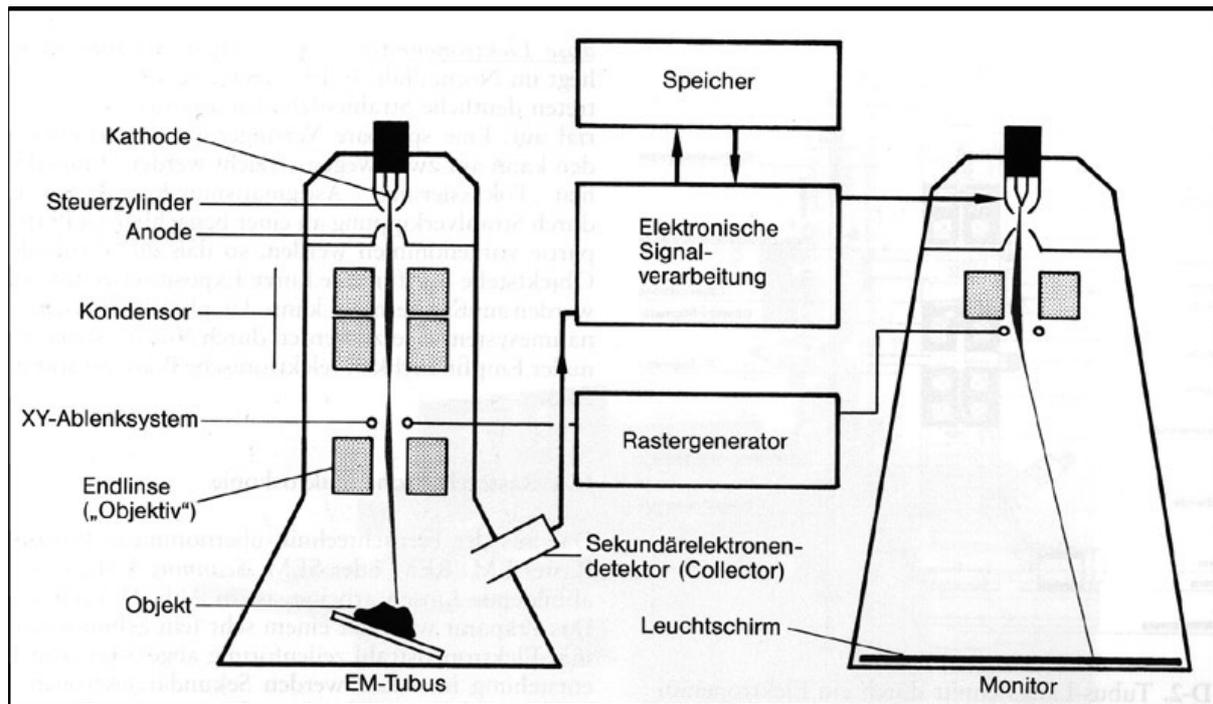


Abbildung 4: Schematische Skizze der Funktionsweise des Rasterelektronenmikroskops

Der Elektronenstrahl wird von der Anode beschleunigt, über Kondensatoren gebündelt und im Objektiv durch einen Rastergenerator abgelenkt. Der feine Elektronenstrahl wird dabei so abgelenkt, dass er das Präparat rastert. Die von der leitend gemachten Probe rückgestreuten Elektronen und Sekundärelektronen werden von einem Elektronen-Kollektor gesammelt und können dann zu einem Bild ausgewertet werden. Da die Elektronen durch Luftmoleküle gestreut werden, muss das Innere des Elektronenmikroskops evakuiert sein. Im REM selbst kann man kein vergrößertes Bild der Probe sehen. Die Vergrößerung ergibt sich aus dem linearen Verhältnis der variablen Raster-Länge über dem Präparat und der fixen Rasterlänge im Monitor. Die Vergrößerung ist bis zu 200.000fach, die maximale Auflösung liegt im Nanometerbereich. Das Präparat muss aufgrund des Vakuums vollständig entwässert sein. Die Oberfläche muss mit einer Kohle oder Metallbeschichtung leitend gemacht werden. Dadurch wird die Absorption von Elektronen vermindert und die Reflexion von Elektronen und Sekundärelektronen verstärkt.

2.3.2. Fixierung und Entwässerung des Präparats für das REM

Das auf ein Mikrofaser Tuch (Typ: extralight, Maratuff, Eckernförde, Deutschland) genähte und mit dem Plasmaskalpell abgetragene Transplantat wurde in 3%igem Glutaraldehyd (mit Phosphatpuffer verdünnt) 24 Stunden eingelegt. Im Anschluss fand ein Spülvorgang in Phosphatpuffer über Nacht statt. Dafür wurde das Glutaraldehyd abgegossen und durch Phosphatpuffer ersetzt. Eine Fixierung wurde mit 1%igen Osmiumtetroxid (OsO₄) durchgeführt. Die Dauer betrug 90 Minuten oder länger, bis das Präparat eine tief schwarze Farbe hatte. Für die Entwässerung wurde das Präparat direkt aus dem Osmiumtetroxid in eine Alkoholreihe gelegt. Diese setzte sich zusammen aus jeweils 15 Minuten in 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% unvergälltem Ethanol. Anschließend wurde das Präparat in absolutem unvergälltem Alkohol (99.9%) bei 4°C gelagert.

Weiter wurden die Präparate mit Hilfe des Critical Point Dryer's (CPD 030, Blazer, Lichtenstein) entwässert. Hierzu wurden sie in das Anatomische Institut der Universität Kiel gebracht, wo auch die Bespatterung und elektronenmikroskopische Untersuchung durchgeführt wurde. Bei der kritischen Punkt Trocknung wurden die Präparate in ihrem Medium, also absolutem Ethanol, in den Trockner gebracht und unter hohem Druck von ca. 52 Bar mit CO₂ bei einer Temperatur von 7°C ausgewaschen. Da bei diesem Druck und Temperatur das CO₂ in flüssiger Form vorliegt, konnte die Druckkammer mit CO₂ Gas geflutet werden, welches sich darin verflüssigte. Schließlich wurde das Kammerventil geöffnet und das CO₂ - Ethanol-Gemisch entleert. Durch die Wiederholung dieses Arbeitsschrittes wurde somit der Alkohol ausgewaschen und immer mehr durch flüssiges CO₂ ersetzt. Für eine komplette Auswaschung waren hierbei meist sechs Wiederholungen notwendig. Die schließlich komplett mit CO₂ gefüllte Druckkammer wurde abschließend auf eine Temperatur von 40°C geheizt. Der Druck stieg dabei auf 85 bis 100 Bar an. Ab ca. 32°C konnte man die Kondensation des CO₂ beobachten. Nach Öffnung des Gasventils glich sich der Druck der Kammer dem atmosphärischen Druck an und der Trockenvorgang war beendet.

2.3.3. Bespatterungsvorgang

Die im Critical Point Dryer getrockneten biologischen Proben haben durch den Wasserverlust auch ihre Leitfähigkeit eingebüßt. Um die Aufladung und die thermische Belastung der Präparate beim Rastern zu vermeiden wurden diese mit einer dünnen Metallschicht aus Gold überzogen.

Die Präparate wurden auf drei Anodenteller angebracht. Vor den Präparaten befand sich ein Gold-Target. Das Gold-Target diente hier als Kathode, die Teller mit den Präparaten als Anode. Die Kammer wurde unter Hochvakuum mit Argon durchflutet, um die Restluft durch dieses bessere Trägergas zu ersetzen.

Bei einer angelegten Hochspannung an die Kathode, setzte eine Gasentladung ein, die in Form einer blauen Plasmaleuchtzone zwischen Kathode und Anode sichtbar war. Durch die Ionisation der Gasmoleküle entstanden Elektronen sowie positiv geladene Argon-Ionen, welche auf die Kathodenoberfläche trafen und dabei Goldatome herausschlugen. Diese Atome setzten sich auf der Anode nieder und bildeten somit eine dünne Metallschicht auf der Probenoberfläche. Die Schichtdicke war dabei abhängig von der Bespatterungszeit, dem Vakuum und der Höhe der Hochspannung.

2.3.4. Verfahren am Rasterelektronenmikroskop

Für die Rasterelektronenmikroskopie wurde der Anodenteller mit dem bespatterten Präparat in die Fixierung innerhalb der Kammer des Raster Elektronen Mikroskops (REM) gesteckt. Zum Öffnen der Kammer wurde diese mit Stickstoff geflutet um ein Hereinströmen von Wasser- und Staubmolekülen zu verhindern. Nach dem Schließen der Tür wurde mit Hilfe der computergestützten Bedienung eine Vakuumpumpe eingeschaltet, die nach 2 bis 5 Minuten einen ausreichend negativen Druck von ca. $5 \cdot 10^{-5}$ mBar hergestellt hatte. Die Bedienungssoftware des angeschlossenen Windows NT 4 Rechners erlaubte es nun in einem „TV-Modus“ Bilder des Transplantats auf dem Computermonitor in Echtzeit als Film zu betrachten. Der „TV-Modus“ gab dabei eine mindere Qualität und Auflösung wieder. Diese Echtzeitwiedergabe erlaubte jedoch das genaue Einstellen und Aufsuchen der auszuwertenden Stellen auf dem Transplantat. Dabei änderten Justierschrauben die räumliche Ausrichtung der Halterung innerhalb der Kammer. Das Transplantat wurde so in den Elektronenstrahl gerückt bzw. es wurde so der Punkt, auf den der Elektronenstrahl traf, variiert. Nachdem die richtige

Stelle gefunden war konnte man den Bild Modus wechseln und zwischen verschiedenen Qualitätsstufen umschalten. Die Bediensoftware ließ es zu, weitere Parameter, wie anliegende Beschleunigungsspannung (meist 15kV), Blendweite, Vergrößerung, sowie Helligkeit und Kontrast zu variieren. Über den Winkel, in dem der Elektronenstrahl auf das Präparat traf, konnte die Darstellung von Tiefen in dem Transplantat, die oft zu dunkel wiedergegeben wurden, stark verbessert werden. Nachdem eine auswertbare Bildwiedergabe eingestellt war, wurde zu dem „Photo-Modus“ gewechselt und damit das maßgebliche Photo in höchst möglicher Qualität gespeichert. Es handelte sich dabei um ein Digitales Photo im TIFF Format mit der Auflösung von 712 x 484 Bildpunkten. Anhand dieser Photos wurde die rastermikroskopische Beurteilung des Transplantatzustandes durchgeführt.

2.4. Histologie

2.4.1. Herstellung des histologischen Präparats

Zur histologischen Analyse wurden die RPE-Chorioidea Transplantate in 3-4%igem Formalin fixiert und über Nacht oder länger gelagert. Nach einer 5-minütigen Wässerung mit Leitungswasser durchlief das Präparat folgende Bäder, wobei alle Zeitangaben Mindestangaben sind und überschritten werden durften. Aufgrund der Empfindlichkeit der Präparate wurden alle Bäder manuell durchlaufen: Aquadest 5 Minuten, 70%iges Ethanol und 80%iges Ethanol jeweils 20 Minuten, 90%iges Ethanol 25 Minuten und 96%iges Ethanol 30 Minuten. Anschließend wurde das Präparat in Trichlormethan bei Raumtemperatur, sowie 15 Minuten bei 60°C gelagert. Es folgte ein 25-minütiges Bad in Paraffin (Mischverhältnis 1:1 Paraffin/Trichlormethan) bei 60°C, sowie ein reines Paraffinbad bei 60°C für 30 Minuten. Der fertige Paraffinblock wurde bei 4°C gelagert und kalt geschnitten, um die nötige Schnittdicke von 2-3µm (1400 Schnittmicrotom, Leitz, Stuttgart, Deutschland) einhalten zu können.

Die fertigen Schnitte wurden nun zum Aufziehen auf den Objektträger in ein Wasserbad bei 52°C gelegt. Für eine bessere Haftung des Schnittpräparats auf dem Objektträger wurde dieser mit Poly-L-Lysine Solution der Firma Sigma Diagnostics INC bestrichen. Anschließend wurden alle Objektträger für mindestens zwei Stunden auf eine auf 38°C erwärmte Platte zum Trocknen gelegt.

Die histologische Auswertung aller Präparate fand in der Hämatoxylin ($C_{16}H_{14}O_6$) (nach Mayer) / Eosin Färbung (HE- Färbung) statt. Zunächst war es nötig das Paraffin wieder zu entziehen und anschließend das Präparat in eine wässrige Lösung zu bringen, da Hämatoxylin ebenfalls in Wasser als Lösungsmittel gelöst ist. Die Entparaffinierung geschah mit Hilfe von Xylol. Dazu wurde der Objektträger in drei verschiedene Xylol gefüllte Küretten jeweils fünf Minuten getränkt. Anschließend fand die Entwässerung durch folgende absteigende Alkoholreihe statt (96%, 90%, 80% 70% unvergälltes Ethanol, jeweils 2 Sekunden)

Zuletzt folgte ein Bad mit destilliertem Wasser, das keine Zeitvorgabe hatte. Nach der Entwässerung konnte die Färbung durch langes Eintauchen (90 Sekunden) in Hämatoxylin stattfinden. Anschließend wurde der Objektträger 10 Minuten unter Leitungswasser gehalten, da die dadurch bewirkte pH-Wert Änderung in den alkalischen Bereich bewirkte, dass die Zellkerne das alkalische Hämatoxylin besser aufnehmen (Anbläuen).

Es folgte ein destilliertes Wasserbad. Das Präparat wurde nun 30 Sekunden lang in Eosin (1% Eosin in 70% Alkohol) getaucht. Die Eindeckung geschah durch eine Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 96% unvergälltes Ethanol) sowie zur Vorbereitung der Eindeckung kurz in Karbolxylol (75% Xylol, 25% Phenol [C_6H_5OH]), dreimalig in Xylol (Dimethylbenzol, aromatischer Kohlenwasserstoff [C_8H_{10}]).

Zum Abschluss wurde das Präparat mit dem Einschlussmittel Permount (Fischer Scientific Company, Waltham, Massachusetts) eingedeckt.

2.4.2. Histologische Auswertung

Die histologischen Präparate wurden mit dem Axio Mikroskop (MRc5, Zeiss, Jena, Deutschland) betrachtet und nach den Einwirkungen des Plasmaskalpells durchsucht. Eine Markierung mit spezieller Farbe (WAK – Chemie Medical GmbH, Steinbach, Deutschland) half die behandelten Areale zu lokalisieren. Entsprechende Präparatanschnitte wurden mit der Mikroskop-Kamera digitalisiert und mittels AxioVisionAC 4.1 Software (Zeiss, Jena, Deutschland) analysiert. Ausgewertet wurden die Dicke des Transplantats und die Tiefe der Abtragung im Verhältnis zu folgenden Plasmaskalpell-Variablen: Spannungsamplitude des Plasmaskalpells, Stößen pro Ladungsimpuls, Pulsweite, Repetitionsrate, Abstand vom Präparat und Dauer der Anwendung am Transplantat. Die statistische Auswertung erfolgte

mittels SPSS Software (SPSS Inc., Chicago, USA). Um die Korrelation und Signifikanz zwischen den einzelnen Parametern zu analysieren wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho und Kendall Tau b errechnet. Ein Signifikanzniveau kleiner $p = 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

2.5. Festlegung der zu untersuchenden Parameter

Die histologische Auswertung zeigt die Tiefe der Abtragung gemessen in Mikrometer im Zusammenhang mit den entscheidenden Parametern Amplitude, Abstand und Dauer. In Voruntersuchungen konnte festgestellt werden, dass zwei Parameter des Zeiss PEAK Plasmaskalpells sich nicht eignen, um die Stärke der Abtragung indikationsgerecht zu variieren, da entweder die Parameter auf ihre maximale Einstellung gestellt werden mussten, um überhaupt eine Abtragung zu erreichen, oder die Veränderung eines Parameters zu unerwünschten Ergebnissen führte. So ergab sich für die Parameter „Stöße pro Ladungsimpuls“ und „Repetitionsrate“ (Definiert als das Zeitintervall zwischen zwei Stößen) zunehmend eine diskontinuierliche Abtragung, je mehr die Werte unter das Maximum eingestellt wurden. Daher wurden diese zwei Parameter während des gesamten Versuchsaufbaus in der Hauptuntersuchung nicht verändert und blieben auf ihren maximalen Werten eingestellt (Stöße pro Ladungsimpuls = 20; Repetitionsrate = 100Hz).

Die Amplitude des Plasmaskalpells wurde in der Hauptversuchsreihe zwischen 70% und 100% variiert, da Einstellungen unterhalb von 70% in den Vorversuchen zu keiner oder nicht ausreichender Abtragung geführt hatten.

Der Parameter „Abstand zwischen dem Plasmaskalpells und dem Transplantat“ konnte prinzipiell frei gewählt werden. Da bei einem zu groß gewähltem Abstand keine Abtragung statt fand wurde für die Hauptversuchsaufbau folgende vier Werte festgelegt: 0 mm, 0,1 mm, 0,2 mm und 0,3 mm.

Die Dauer einer Applikation wurde festgelegt auf 2s, 4s, 6s, 8s und 10s. Es wurde darauf geachtet einen Zeitrahmen zu wählen, der für in vitro Operationen am Auge gut durchführbar und reproduzierbar ist.

Für die Hauptuntersuchungsreihe wurden daher folgende Standardwerte festgelegt: Die Amplitude betrug 90%, der Abstand zum Präparat betrug 0,1 mm und die Dauer einer

Anwendung am Transplantat wurde auf 10 Sekunden festgelegt. Ausgehend von diesen Standardeinstellungen wurde jeweils nur einer der drei Standardparameter (Amplitude, Dauer, Abstand) variiert, um die Auswirkung des jeweiligen Parameters auf den Gewebeabtrag zu untersuchen.

3. Ergebnisse

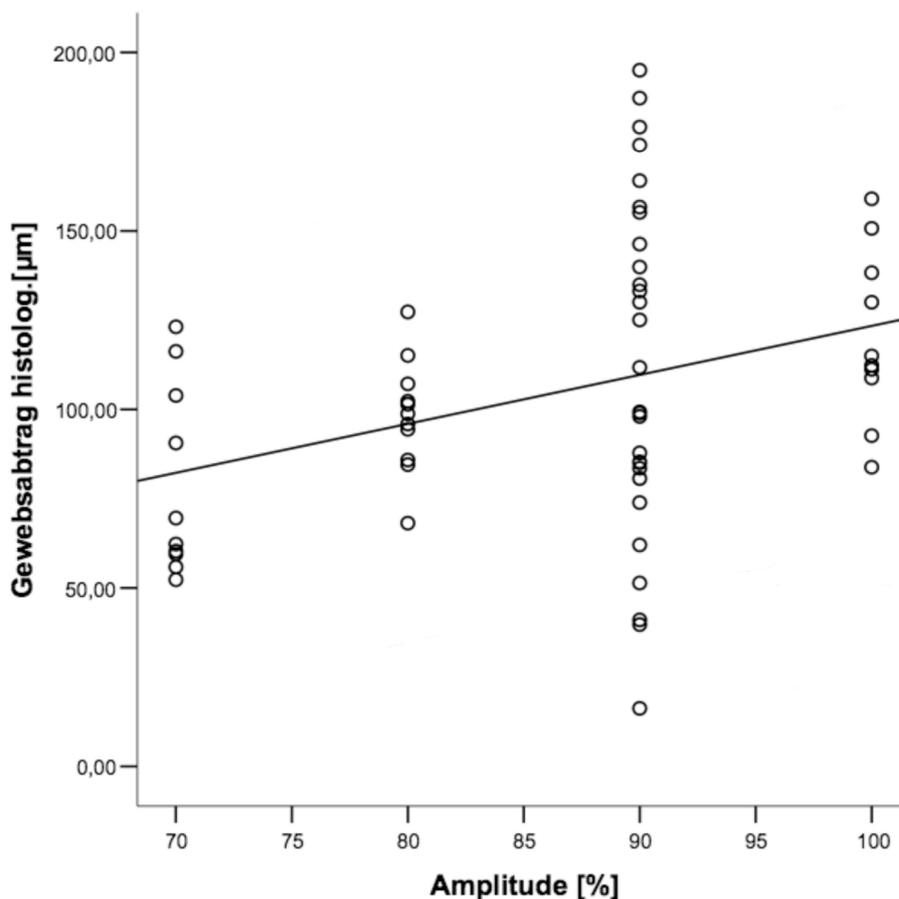
3.1. Ergebnisse der Wirkung des Parameters Amplitude

Tabelle 1 zeigt die histologisch gemessenen Abtragungstiefen in μm bei Variation des Parameters Amplitude der angelegten Spannung. Man erkennt, dass die mittlere Abtragungstiefe mit Zunahme der Amplitude ansteigt. Bei der niedrigsten Amplitude (70%) wurden im Mittel $79\mu\text{m}$ chorioidales Gewebe abgetragen, bei der maximalen Amplitudeneinstellung (100%) wurden im Mittel $120\mu\text{m}$ abgetragen. Dabei zeigte sich die geringste Standardabweichung bei einer Amplitude von 80% (Mittelwert: $98\mu\text{m}$, Standardabweichung: $16\mu\text{m}$), während bei einer Amplitude von 90% die größte Standardabweichung beobachtet wurde (Mittelwert: $111\mu\text{m}$, Standardabweichung: $48\mu\text{m}$).

Graphik 1 zeigt alle histologisch gemessenen Abtragungstiefen bei Variation des Parameters „Amplitude der Spannung“. Dargestellt wird die interpolierte Mittelwertachse. Die darüber bzw. darunter angeordneten Linien entsprechen den interpolierten Standardabweichungen. Man erkennt einen linearen Zusammenhang zwischen dem Parametern Spannung und dem erreichten Gewebeabtrag. Die statistische Analyse ergab einen Korrelationskoeffizienten nach Spearman von $0,343$, $p = 0,007$. Die Korrelation nach Kendall Tau beträgt $0,255$, $p = 0,01$.

Amplitude [%]		N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
70	Gewebsabtrag histolog.[μm]	10	79,3610	26,74110	52,30	123,14
80	Gewebsabtrag histolog.[μm]	11	98,2509	15,82076	68,13	127,29
90	Gewebsabtrag histolog.[μm]	29	110,8855	47,52453	16,24	195,00
100	Gewebsabtrag histolog.[μm]	10	120,1710	24,13876	83,80	158,99

Tabelle 1: Analyse der histologischen gemessenen chorioidalen Gewebeabtrags bei verschiedenen Werten des Parameters „Amplitude der Spannung“ (70%, 80%, 90%, 100%). Dargestellt ist der Mittelwert [μm], die Standardabweichung [μm], sowie der minimal und maximal erreichte Gewebeabtrag [μm].



Graphik 1: Analyse der histologischen gemessenen chorioidalen Gewebeabtrags bei verschiedenen Werten des Parameters „Amplitude der Spannung“ [%]. Es zeigt sich ein

linearer Zusammenhang zwischen dem Parameter „Amplitude der Spannung“ und dem Gewebeabtrag [μm].

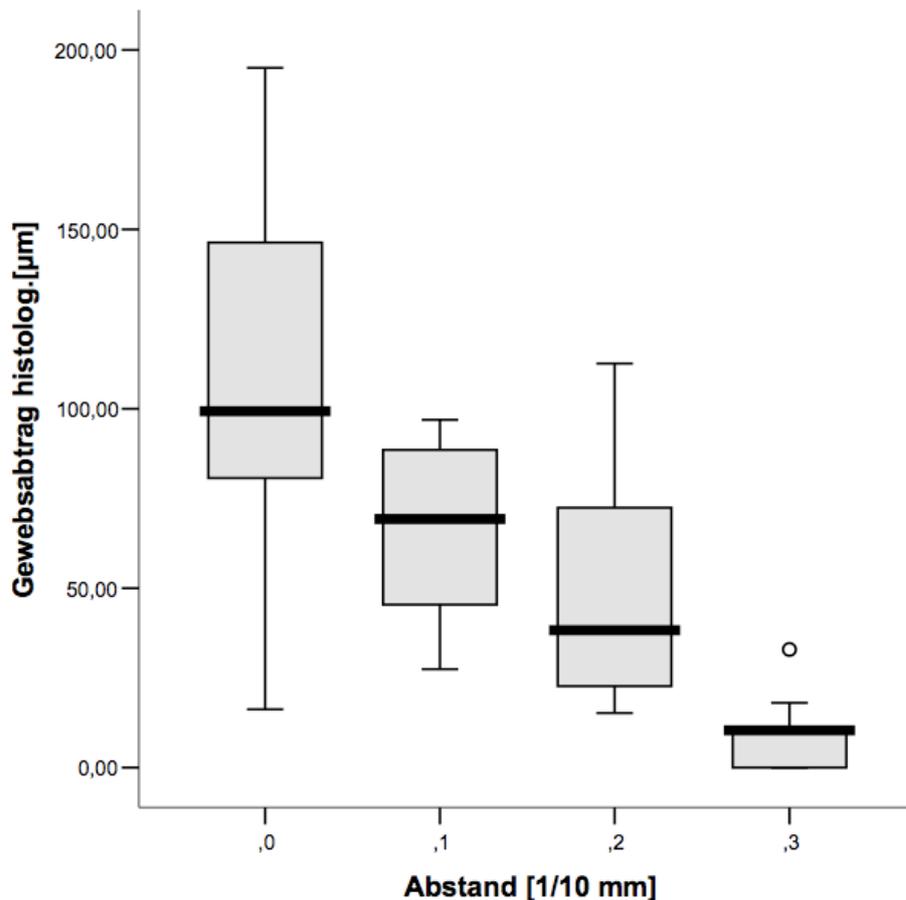
3.2. Ergebnisse der Wirkung des Parameters Abstand

Tabelle 2 und Graphik 2 zeigen den Zusammenhang zwischen dem Abstand der Skalpellspitze (0mm, 0,1mm, 0,2mm, 0,3mm) vom Transplantat und dem erzielten Gewebeabtrag in Mikrometern. Der größte Gewebeabtrag wird beim direkten Berühren des Gewebes (Abstand 0mm) erzielt (Mittelwert 110 μm , Standardabweichung 47,5 μm (Min. = 16 μm , Max. = 195 μm). Beim größten Abstand (0,3mm) wurde der geringste Gewebeabtrag erzielt (Mittelwert = 9,2 μm , Standardabweichung = 11,9 μm , Min. = 0 μm , Max. = 32,9 μm).

Die statistische Auswertung der histologischen Messung zeigte einen negativ linearen Zusammenhang zwischen dem Parameter Abstand der Instrumentenspitze vom Präparat und dem erreichten Gewebeabtrag. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman beträgt 0,742, $p = 0,01$, der nach Kendall berechnete Korrelationskoeffizient beträgt 0,619, $p = 0,01$.

Abstand [1/10 mm]		N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
,0	Gewebsabtrag histolog.[μm]	29	110,8855	47,52453	16,24	195,00
,1	Gewebsabtrag histolog.[μm]	9	65,4278	25,37079	27,43	96,92
,2	Gewebsabtrag histolog.[μm]	8	49,3188	33,76971	15,21	112,60
,3	Gewebsabtrag histolog.[μm]	9	9,2278	11,09472	,00	32,90

Tabelle 2: Analyse des histologische gemessenen chorioidalen Gewebeabtrags [μm] bei verschiedenen Werten des Parameters Abstand (1/10mm) der Instrumentenspitze vom chorioidalen Gewebe.



Graphik 2: Analyse der histologischen gemessenen chorioidalen Gewebeabtrags [μm] (Median) bei verschiedenen Werten des Parameters Abstand [1/10mm] der Instrumentenspitze vom chorioidalen Gewebe. \circ = statistischer Ausreisser

3.3. Ergebnisse der Wirkung des Parameters Dauer

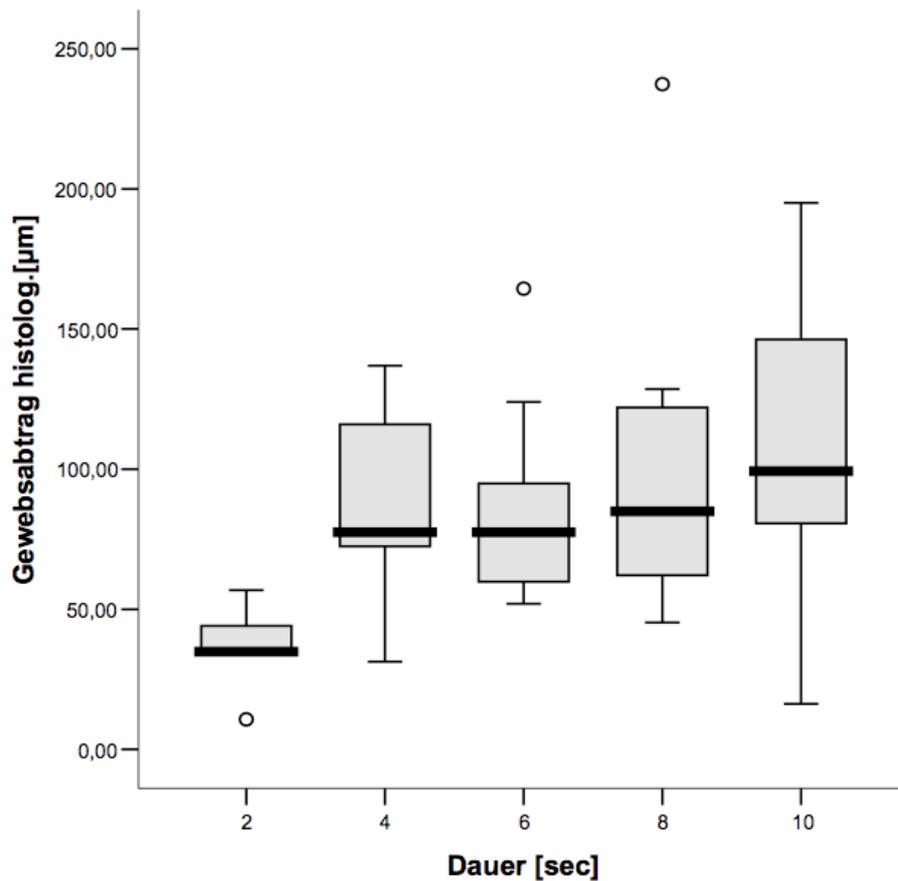
Tabelle 3 und Graphik 3 zeigen den Zusammenhang zwischen der Dauer einer Applikation (die Dauer für die das Plasmaskalpell eingeschaltet wurde) für die voreingestellten Zeitintervalle von 2s, 4s, 6s, 8s, 10s und dem damit erzielten chorioidalen Gewebeabtrag in Mikrometern. Der geringste Gewebeabtrag wird bei 2 Sekunden Applikationsdauer erreicht (Mittelwert $35,9\mu\text{m}$, (Standardabweichung $15,1\mu\text{m}$; Min. = $10,71\mu\text{m}$, Max. = $56,8\mu\text{m}$). Der stärkste Gewebeabtrag wird bei 10s Applikationsdauer erreicht (Mittelwert $110\mu\text{m}$, Standardabweichung $47,5\mu\text{m}$, Min. = $16,2\mu\text{m}$, Max. = $195\mu\text{m}$).

Die histologischen Messungen zeigen eine deutliche Zunahme der Abtragungstiefe bei Verlängerung der Applikationsdauer von 2 Sekunden (Mittelwert 35,9 μ m) auf 4 Sekunden (Mittelwert 88,6 μ m). Längere Applikationen (6s, 8s, 10s) sind dann jedoch nicht mehr mit einer deutlichen Steigerung der Abtragungstiefe verbunden. Die statistische Auswertung ergab einen Korrelationskoeffizient nach Spearman von 0,420, $p = 0,001$

Der nach Kendall berechnete Korrelationskoeffizient beträgt 0,322, $p = 0,001$

Dauer [sec]		N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
2	Gewebsabtrag histolog.[μ m]	6	35,9183	15,12828	10,71	56,80
4	Gewebsabtrag histolog.[μ m]	11	88,4682	33,32299	31,27	136,92
6	Gewebsabtrag histolog.[μ m]	10	86,2750	34,97491	51,93	164,40
8	Gewebsabtrag histolog.[μ m]	10	97,6800	56,73656	45,26	237,37
10	Gewebsabtrag histolog.[μ m]	29	110,8855	47,52453	16,24	195,00

Tabelle 3: Analyse der histologischen gemessenen chorioidalen Gewebeabtrags [μ m] bei verschiedenen Werten des Parameters Dauer [s] der Plasma-Applikation. Dargestellt ist der Mittelwert [μ m], die Standardabweichung [μ m], sowie der minimal und maximal erreichte Gewebeabtrag [μ m].



Graphik 3: Analyse der histologischen gemessenen chorioidalen Gewebeabtrags. Dargestellt ist der Mittelwert [μm], die Standardabweichung [μm], sowie der minimal und maximal erreichte Gewebeabtrag [μm] (Mittelwert) bei verschiedenen Werten des Parameters Dauer [s] der Plasma-Applikation.

3.4. Beurteilung von Kollateralschäden im histologischen Schnitt

Ziel der Gewebeabtragung mit dem Plasmaskalpelle ist, die Chorioidea des RPE-Chorioidea Transplantats mikrochirurgisch exakt abzutragen. Dabei dürfen tiefer liegende Gewebestrukturen wie die Choriokapillaris und vor allem die Bruch-Membran sowie das retinale Pigmentepithel nicht beschädigt werden. Die histologischen Schnitte des RPE-Chorioidea Präparats wurden daher auf mögliche Kollateralschäden im Bereich der Plasmaskalpelle-gestützten Abtragungen untersucht.

Abbildung 5 zeigt einen histologische Schnitt einer intensiven Punktabtragung durch das Plasmaskalpell Zeiss PEAK FC (Amplitude = 90%, Abstand = 0,1mm, Dauer = 10s). Zu erkennen ist der kraterförmige Substanzdefekt. Die Oberfläche wird von blauer Markierungsfarbe überzogen. Die Abtragungstiefe beträgt 95,9 μ m bei einer Gesamtdicke des chorioidalen Gewebes von 273,6 μ m. Die angrenzenden Zellen sind in ihrer Morphologie erhalten und es lassen sich keine Koagulationseffekte in der Struktur des Gewebes unterhalb und neben der Ablation erkennen.

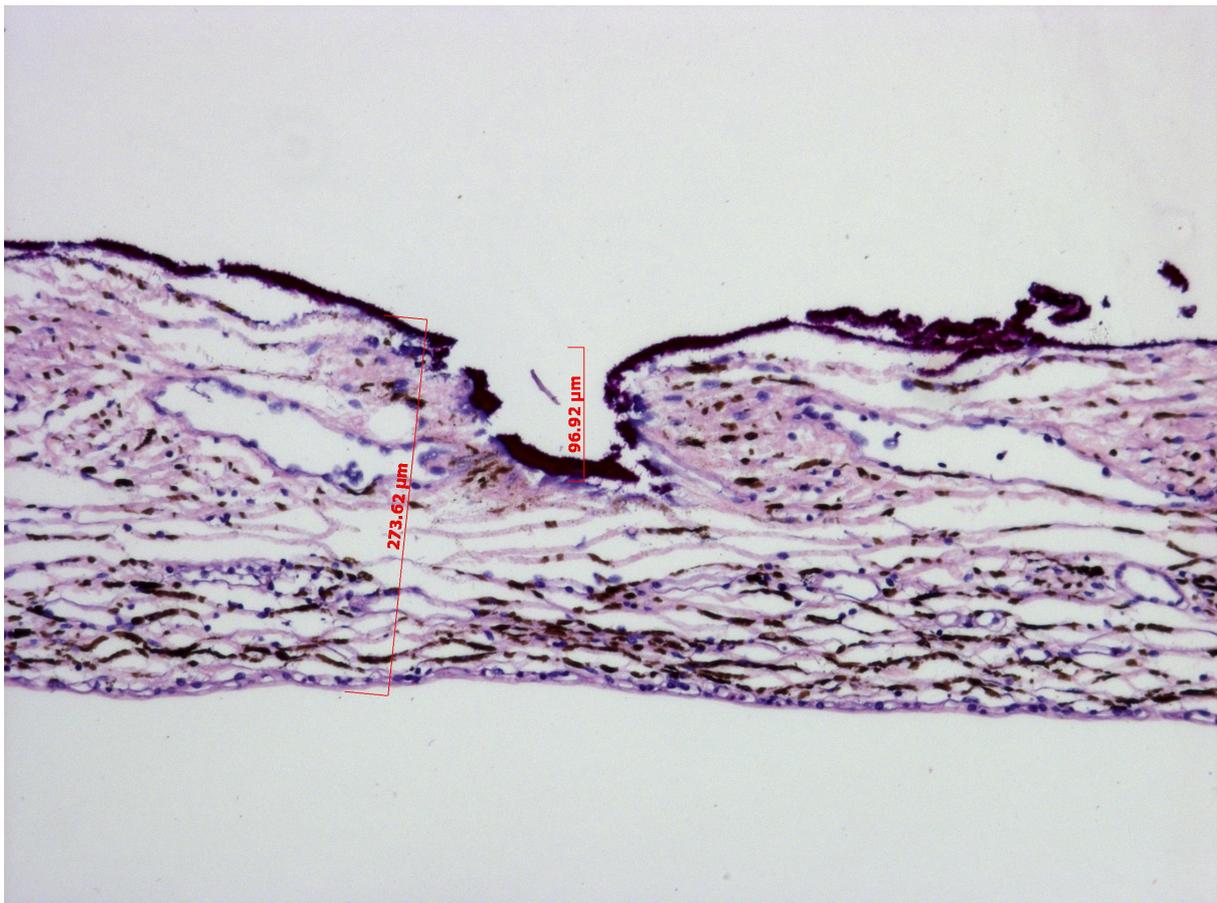


Abbildung 5: Starke Punktabtragung (Amplitude = 90%, Abstand = 0,1mm, Dauer = 10s) mit dem Zeiss Plasmaskalpell an der Chorioidea,, Paraffinschnitt, HE-Färbung.

Abbildung 6 zeigt eine sehr starke Ablation (Amplitude = 90%, Abstand = 0mm, Dauer = 10s) durch das Zeiss PEAK FC Plasmaskalpell an der Chorioidea. Die chorioidale Oberfläche im Bereich der Abtragung ist durch blaue Markierungsfarbe gekennzeichnet. Die Abtragungstiefe beträgt 114,6 μ m bei einer Gesamtdicke von 215,5 μ m. Auch bei dieser sehr starken Ablation

sind keine histologischen Korrelate für Koagulationseffekte in der Chorioidea, unterhalb der Ablation zu erkennen.

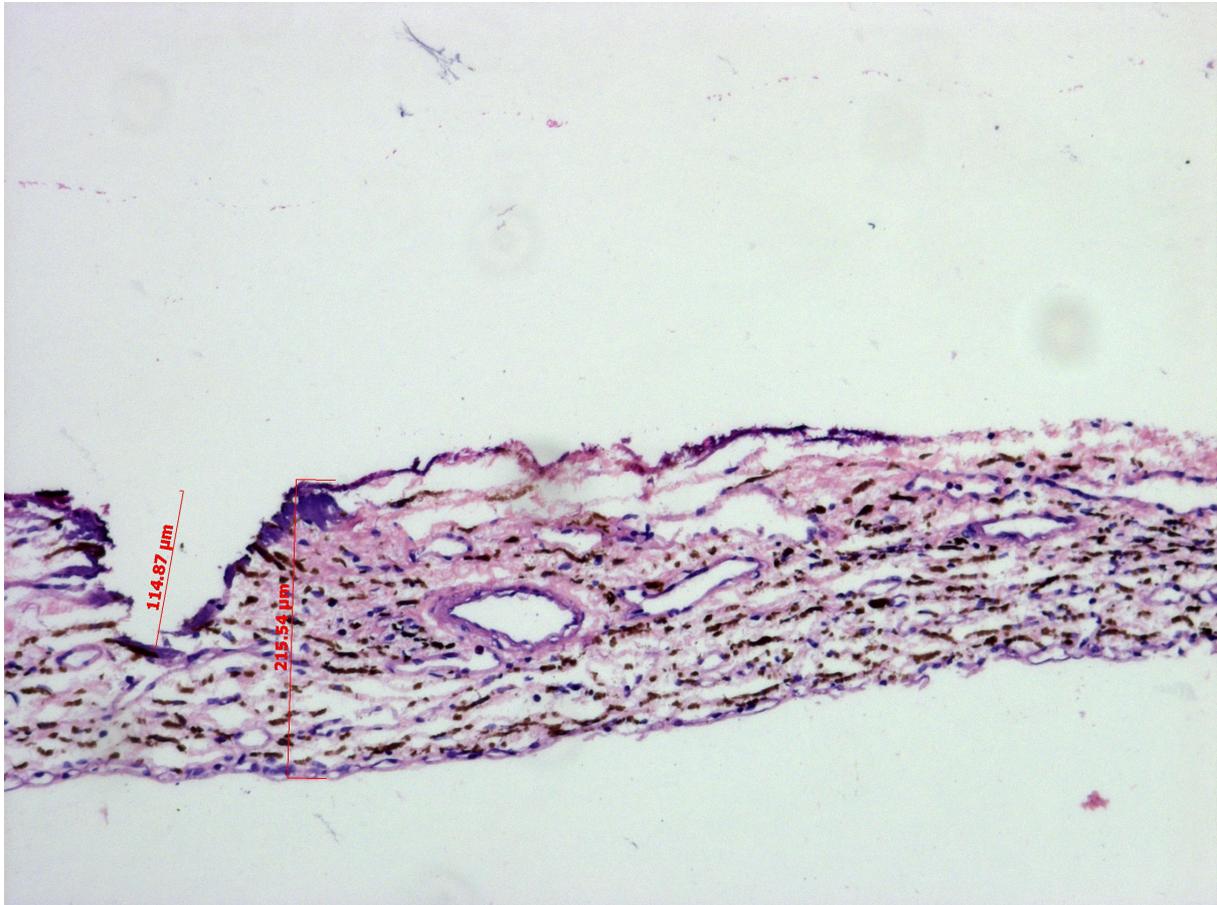


Abbildung 6: Sehr starke (Amplitude = 90%, Abstand = 0 mm, Dauer = 10s) Punktabtragung mit dem Zeiss Plasmaskalpelli an der Chorioidea, Paraffinschnitt, HE Färbung.

3.5. Ergebnisse der Rasterelektronen Mikroskopie

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Transplantate wurde durchgeführt, um mögliche ultrastrukturelle Veränderungen der abgetragenen chorioidalen Oberfläche beurteilen zu können. Die Aufnahmen zeigen, dass eine gleichmäßige Abtragung chorioidalen Gewebes möglich ist. Hierbei bleibt die Oberflächenstruktur im Vergleich zu den angrenzenden, nicht ablatierten Bereichen gut erhalten. Abbildung 7 zeigt ein elektronenmikroskopisches Bild der Chorioidea nach Einwirkung des Plasmaskalpells (Amplitude = 90%, Abstand = 0mm; 200-fache Vergrößerung). Links im Bild erkennt man die

leicht unregelmäßige Oberfläche der manuell präparierten Chorioidea. Rechts im Bild innerhalb der Markierung sieht man die vertiefte und vergleichsweise glatte Oberfläche der Chorioidea nach Plasmaskalpell Abtragung.

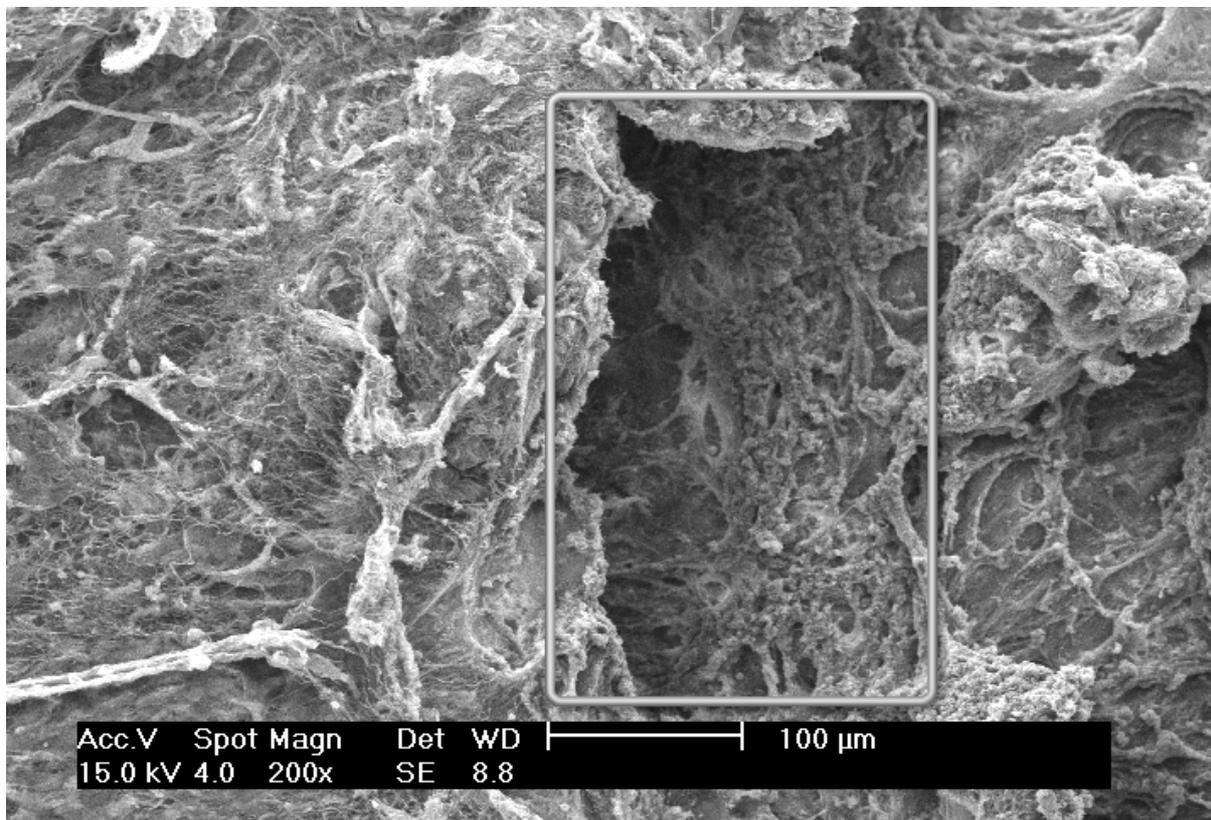


Abbildung 7: Elektronenmikroskopisches Bild der Chorioidea. Gut zu erkennen ist die vertiefte und vergleichsweise glatte Oberfläche nach Plasmaskalpell-Abtragung innerhalb der rechteckigen Markierung rechts im Bild (Amplitude = 90%, Abstand = 0mm, 200-fache Vergrößerung).

Abbildung 8 zeigt eine typische Abtragung durch das Zeiss PEAK-FC Plasmaskalpell (Amplitude = 90%, Abstand = 0,1mm, Dauer = 2s; 200-fache Vergrößerung) auf dem Transplantat. Gut zu erkennen ist die um wenige µm vertiefte Oberfläche. Die Abtragung hat eine ovale Form und zeigt sich scharf begrenzt ohne ein unkontrolliertes Auslaufen der Ränder in das unbehandelte Gewebe. Die erreichte Abtragung ist flächenhaft mit einer gleichmäßigen Tiefe. Kraterförmige Vertiefungen, die auf eine unregelmäßige und gegebenenfalls zu tiefe Ablation hinweisen, lassen sich nicht erkennen.

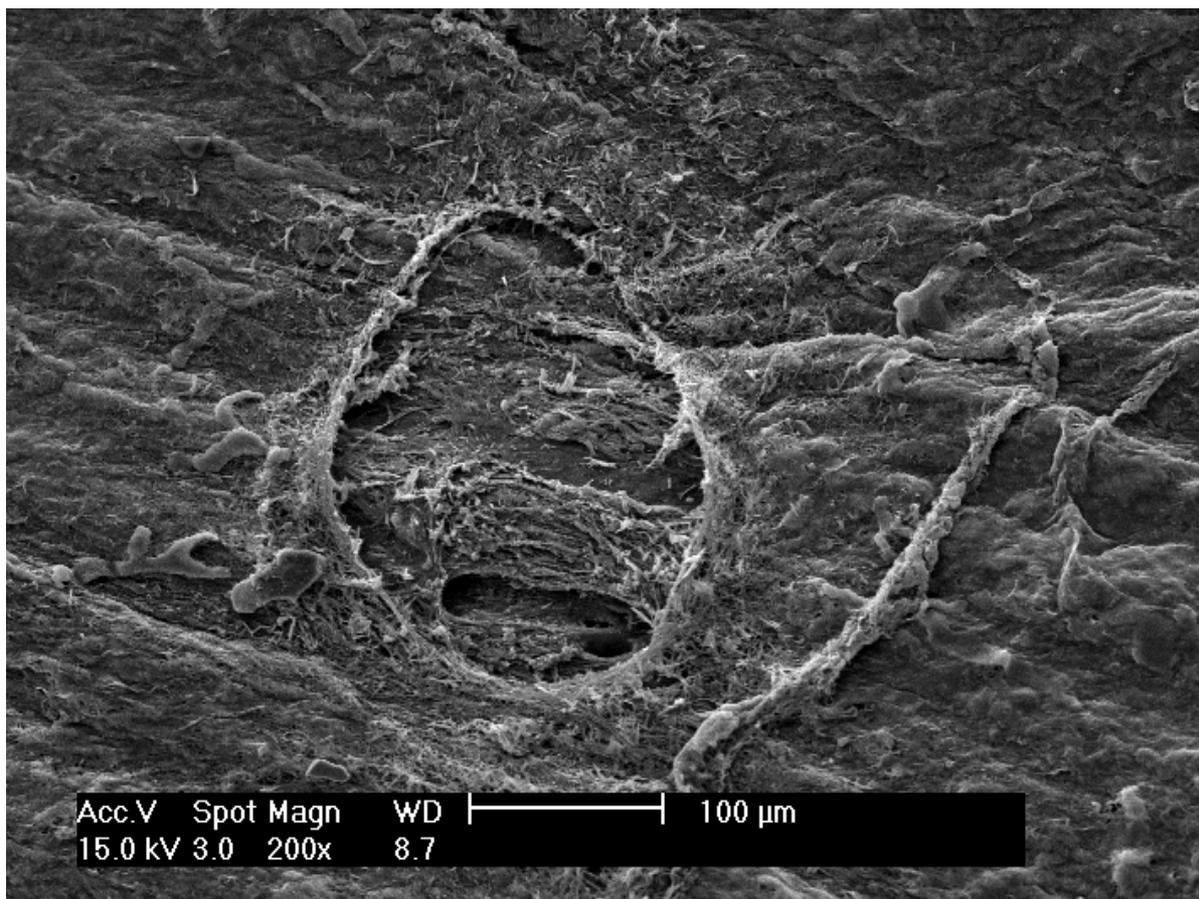


Abbildung 8: Elektronenmikroskopisches Bild der Chorioidea. Gut zu erkennen ist die abgegrenzte Punktabtragung durch das Zeiss PEAK FC Plasmaskalpell mit geringer Stärke (Amplitude = 90%, Abstand = 0,1mm, Dauer = 2s; 200-fache Vergrößerung).

3.6. Visuelle Kontrolle der Abtragungstiefe

Die visuelle Kontrolle der Abtragungstiefe spielt eine große Rolle bei der Behandlung mit dem Plasmaskalpell. Die Tiefe der Abtragung muss durch den Operateur intraoperativ visuell bestimmt werden. Die Tiefe der Abtragung muss durch den Operateur intraoperativ visuell bestimmt werden. Die mit dem Plasmaskalpell durchgeführten Veränderungen sind auf der Chorioidea direkt sichtbar. Um kontrollieren zu können ob die sichtbaren Veränderungen tatsächlich mit den histologischen Messungen übereinstimmen, wurden alle intraoperativ wahrgenommenen Veränderungen im Ablationsareal notiert und mit den histologischen Messungen verglichen. Während stärkste Veränderungen wie Löcher in der Retina offensichtlich sind, wurden leichte Veränderungen zunächst nur durch Farbveränderungen im

Sinne von leichten Aufhellungen der abladierten Chorioidea erkennbar. Mäßige Abtragungen ließen leichte Vertiefungen in der Netzhaut erkennen. Stärkere Abtragungen imponierten als Kraterbildung bzw. starke Absenkungen.

Die visuelle Abschätzung wurde in folgende 6 Stufen eingeteilt:

Stufe 0 = keine Veränderung

Stufe 1 = Aufhellung der Chorioidea

Stufe 2 = kleinster erkennbarer Gewebeabtrag oder Randwallbildung

Stufe 3 = deutlich erkennbarer Gewebeabtrag

Stufe 4 = tiefer Gewebeabtrag; bei sehr dünnen Präparaten evtl. erste Anzeichen eines Loches

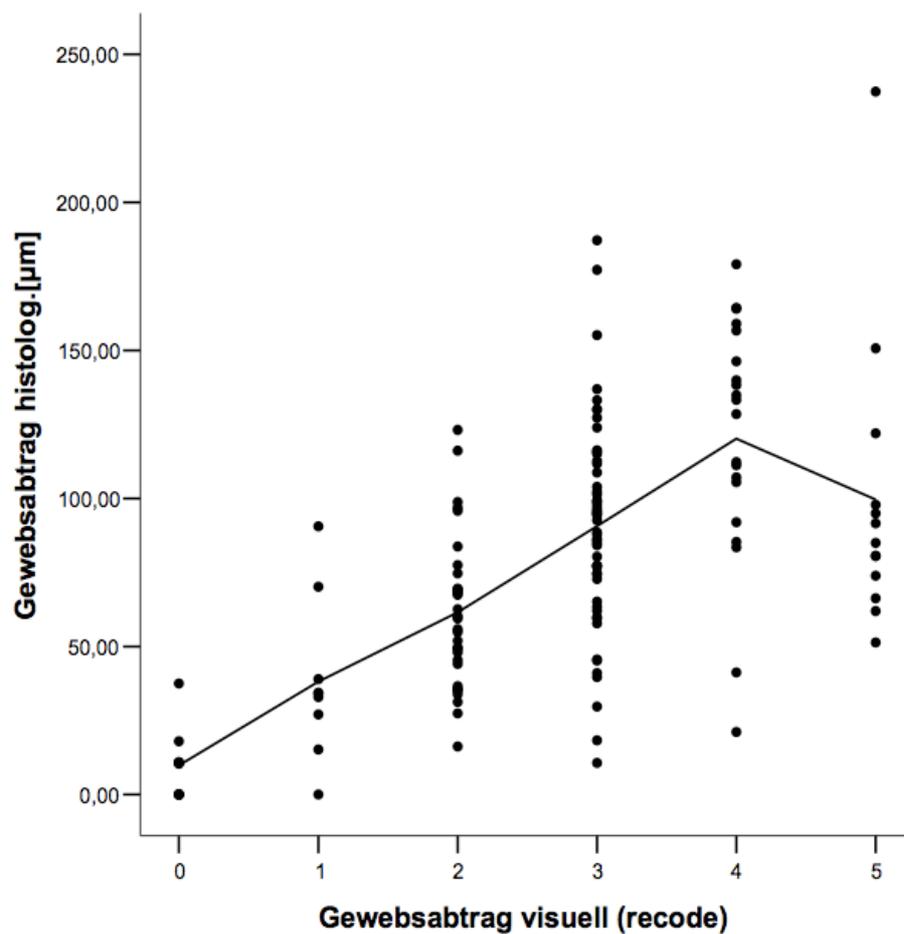
Stufe 5 = deutlich erkennbares Loch im Präparat

Tabelle 4 und Graphik 4 zeigen die visuelle Einschätzung die jeweils histologisch gemessene Abtragungstiefe in μm . Die Tabelle zeigt den Mittelwert aller gemessenen Abtragungstiefen, die bei der visuellen Einschätzung den gleichen Punktwert erhalten haben. Man erkennt, dass die visuelle Skala zwischen dem Punktwert 1 und 5 mit kontinuierlich ansteigenden Mittelwerten der histologisch gemessenen Abtragungstiefe in μm einhergeht.

Die statistische Analyse ergab einen Korrelationskoeffizient nach Pearson von 0,689, $p = 0,01$.

Gewebsabtrag visuell (recode)		N	Mittelwert	Standardab- weichung	Minimum	Maximum
0	Gewebsabtrag histolog.[μm]	10	9,8410	11,66645	,00	37,55
1	Gewebsabtrag histolog.[μm]	9	38,1644	27,24873	,00	90,58
2	Gewebsabtrag histolog.[μm]	31	61,5439	25,73849	16,24	123,14
3	Gewebsabtrag histolog.[μm]	53	90,6542	35,53478	10,70	187,20
4	Gewebsabtrag histolog.[μm]	20	120,1895	41,01735	21,14	179,08
5	Gewebsabtrag histolog.[μm]	13	99,5700	48,83970	51,36	237,37

Tabelle 4: Dargestellt ist der visuell geschätzte Gewebeabtrag (subjektiver Score 0-5) und der gemessene chorioidale Gewebeabtrag (Mittelwert, Standardabweichung, Minimum, Maximum) im histologischen Präparat in μm .



Graphik 4: Dargestellt ist der visuell abgeschätzte Gewebeabtrag (subjektiver Score 0-5) im Vergleich zum histologisch gemessenen Gewebeabtrag in μm . Im Bereich von Score 0 bis Score 4 besteht ein linearer Zusammenhang zwischen visueller Einschätzung und histologische gemessenen Gewebeabtrag.

In der Statistik wurden auch diejenigen Fälle berücksichtigt, die ein Loch im Transplantat hinterließen. Die Transplantate variierten, operationstechnisch bedingt, in ihrer Dicke zwischen $150\mu\text{m}$ und $350\mu\text{m}$. Da der Versuchsaufbau bei allen Transplantatdicken gleich war, entstanden in dünneren Präparaten deutlich häufiger Löcher als in dickeren Präparaten. Die maximal gemessene Dicke im Fall eines Loches entsprach somit häufig der maximalen Dicke eines dünnen Präparats. Dieser Zusammenhang erklärt, warum in Grafik 4 bei der höchsten visuellen Skala (Stufe 5 = deutlich erkennbares Loch im Präparat) im Durchschnitt nur eine niedrige Abtragungstiefe gegenüber steht. Hierdurch kommt es zu einer hohen Streuung in der Grafik ab der visuellen Bewertungsstufe ≥ 4 . Intraoperativ sind die Stufen 4 und 5 ohnehin zu keinem Zeitpunkt gefordert oder erwünscht. Der visuellen Bewertungsskala Stufe 3 entsprach eine mittlere Abtragung von $61\mu\text{m} \pm 26\mu\text{m}$. Dies ist unter unseren Versuchsbedingungen die stärkste Abtragung, die visuell kontrolliert möglich ist, um einen ausreichenden Sicherheitsabstand zur Bruch-Membran und dem RPE zu gewährleisten.

Die statistische Auswertung zeigt also, dass das Ausmaß des Gewebeabtrags, welcher durch das Zeiss PEAK-FC Plasmaskalpell verursacht wird, visuell durch den Operateur gut eingeschätzt werden kann. Dies ist eine wichtige Voraussetzung, um eine Abtragung auch intraoperativ während der Vitrektomie sicher durchzuführen, ohne die Gefahr das Pigmentepithel zu beschädigen und damit den Erfolg der Operation zu gefährden.

4. Diskussion

Das retinale Pigmentepithel (RPE) ist ein einschichtiges, kuboides Epithel zwischen den retinalen Photorezeptoren und der Chorioidea. Bei der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) kommt es zu einem Verlust dieser Epithelschicht entweder durch den degenerativen Krankheitsprozess selbst (nicht exsudative AMD) oder im Falle der chirurgischen Behandlung

der exsudativen AMD während der operativen Extraktion einer chorioidalen Neovaskularisation (CNV).

Es wurden viele Versuche durchgeführt, die Integrität dieses Epithels durch eine RPE-Transplantation wiederherzustellen. Versuche RPE-Zellsuspensionen subretinal zu injizieren scheiterten, da keine Einschichtigkeit des Pigmentepithels hergestellt werden konnte und die Polarisierung der injizierten Zellen unklar blieb (Lappas et al. 2004, van Meurs et al. 2004). Auch Experimente mit allogenen RPE-Chorioidea Transplantaten führten nicht zum Erfolg, da es zu einer subretinalen Fibrosereaktion als Zeichen der Transplantatabstoßung kam (Algvere et al. 1994, Algvere et al. 2006).

Die beste Lösung, das degenerierte RPE möglichst in seinem natürlichen Aufbau zu ersetzen scheint deshalb ein autologes RPE-Chorioidea Translokate zu sein, welches aus einschichtigem RPE, Bruch-Membran (Basalmembran) und der Chorioidea besteht. Diese Technik wurde erstmals von Peyman (Payman et al. 1991) beschrieben und inzwischen konnte in mehreren Fallserien gezeigt werden, dass dieses Operationsverfahren vergleichsweise komplikationsarm durchführbar ist und postoperativ eine retinale Lichtempfindlichkeit und Fixation auf dem Translokate möglich ist (Treumer et al. 2007, Jousseaume et al. 2006, Stanga et al. 2002, van Meurs et al. 2003). Jedoch bleibt der postoperative Visus meist auf einem niedrigen Niveau. Das histologische Korrelat für diese schwachen funktionellen Ergebnisse könnte die am Schweineauge in einigen Fällen beobachtete Degeneration der über dem Translokate liegenden neuronalen Netzhautschichten sein. Interessanterweise wurde diese Degeneration auch beobachtet, wenn das Translokate vital war und histologisch Anschluss an die chorioidale Vaskularisation gefunden hatte (MacLaren et al. 2005). Eine Ursache hierfür könnte sein, dass die Chorioideaschicht des Translokates zu dick war. Die postoperative Vaskularisation des RPE-Chorioidea Translokates nimmt einige Wochen in Anspruch. Während dieser Zeit muss das RPE und die neuronale Netzhaut durch Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff aus der tiefliegenden, intakten Chorioidea des Empfängerbettes ernährt werden. Eine chirurgische Ausdünnung der Chorioideaschicht des RPE-Chorioidea-Translokates könnte die nutritive Versorgung des RPE und der neuronalen Netzhaut in dieser kritischen Zeitspanne verbessern und damit möglicherweise einer Degeneration dieser Zellschichten entgegenwirken. Unter dieser Annahme führten Hu et al. autologe „partial thickness“ RPE-Chorioidea Translokationen am Kaninchenauge durch (Hu et al. 2008). Hierbei dünneten sie die Chorioideaschicht bei der Präparation des Translokates intraoperativ

mit einem Spatel aus. Sie konnten dadurch die Gesamtdicke des Translokates auf ca. 50-60 µm reduzieren. Histologisch zeigte sich ein vitales RPE und eine intakte neuronale Netzhaut bei 17 von 25 operierten Tieren mit einem Follow-up von 6 Monaten. Immunhistologisch ließ sich die Expression des RPE-Markers CRALBP in den RPE Zellen nachweisen als Zeichen der weiter bestehenden Differenzierung dieser Zellen. Auch die Expression von Rhodopsin konnte in allen dieser 17 Fälle sowohl im RPE als auch in den Photorezeptoren nachgewiesen werden und deutet auf einen gut erhaltenen Metabolismus zwischen den RPE Zellen und der Photorezeptorschicht hin. Die intraoperative Ausdünnung der Chorioideaschicht des Translokates mit einem Spatel ist jedoch vergleichsweise grob und ungenau zu reproduzieren, die mechanische Belastung für das nur wenige Mikrometer dicke Translokate ist stark und Lochbildungen im Translokate sind schwierig zu vermeiden.

Daher wurde in dieser Arbeit die kontrollierte Ausdünnung der Chorioideaschicht mit einem Plasmaskalpells untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass vor allem mit zwei Parametern die Wirkung des Plasmaskalpells variiert werden kann. Es zeigte sich ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen dem erreichten Gewebeabtrag und den Parametern „Abstand der Skalpellspitze“ von der Chorioidea und „Amplitude der angelegten Spannung“. Der erreichte Gewebeabtrag bei Variation des Parameters „Dauer der Plasma-Einwirkung“ zeigte dagegen ein Plateau im Bereich zwischen 4 und 8 Sekunden. Das heißt, dass in dieser Zeitspanne eine längere Einwirkzeit des Plasmas nicht zu einem erhöhten Gewebeabtrag der Chorioideaschicht führt. Dieses Plateau ist über die begrenzte räumliche Ausdehnung des Plasmas je nach angelegter Spannung zu erklären und bietet einen guten Schutz vor einer ungewollt tiefen Abtragung.

In den histologischen und elektronenmikroskopischen Präparaten konnte eine scharf begrenzte Ablation ohne thermischen Kollateralschaden des angrenzenden Gewebes aufgezeigt werden.

Die Handhabung des Skalpells war schnell zu erlernen. Die Parameter „Amplitude der Spannung“ und „Abstand“ dienen dazu, die Abtragsstärke während einer Ablation zu variieren und auf die jeweilige Situation und das Transplantat anzupassen. Bei flächigen Abtragungen konnte durch kreisende Bewegung mit der Instrumentenspitze eine sehr gleichmäßige Ausdünnung erreicht werden.

Die weiteren Parameter des Gerätes Zeiss PEAK-FC Plasmaskalpell „Wiederholungsrate [Hz]“ und „Pulse pro Stoß [Anzahl der Stöße]“ wurden immer auf den maximalen Wert eingestellt, um eine gleichmäßige Abtragung zu erreichen (maximale Pulse pro Stoß = 20; maximale Wiederholungsrate = 80Hz). Bei niedrigeren Geräteeinstellungen war nur eine sehr geringe und oft nicht kontinuierliche Abtragung zu erzielen.

Der Abstand zum Präparat konnte dadurch sehr gut eingeschätzt werden und gut korrigiert werden. Weiter hat sich bewährt, die Nadelspitze leicht umzubiegen und diese parallel statt senkrecht zum Transplantat zu führen. Hierdurch konnte eine gleichmäßigere Flächenabtragung erreicht werden. Wurde die Nadel senkrecht aufgesetzt bestand die Gefahr in bindegewebigen Oberflächenstrukturen der Choriokapillaris hängen zu bleiben und ein Loch in das Transplantat zu schneiden.

Das Plasmaskalpell bietet also die Möglichkeit über den Abstand zum Gewebe und über die eingestellte Leistung die Intensität der Ablation gut zu dosieren und damit eine flächige und zur Tiefe hin begrenzte Gewebeabtragung zu erreichen. An der Instrumentenspitze steht eine fiberoptische Lichtquelle zur Verfügung die das Operationsfeld optimal ausleuchtet und die Ablation gut kontrollieren lässt. Einen weiteren Vorteil bietet das Plasmaskalpell dadurch, dass sich das abgetragene Material in der Plasmawolke auflöst und nicht feine Gewebepartikel im Glaskörper fluktuieren und die intraoperativen Sichtverhältnisse verschlechtern.

Angesichts der günstigen Ergebnisse der intravitrealen VEGF-Blockade sind komplexe netzhautchirurgische Verfahren zur Behandlung der exsudativen AMD in den Hintergrund getreten. Dennoch kann eine autologe RPE-Chorioidea Translokation in Einzelfällen erwogen werden. So ist diese operative Option beispielsweise bei Patienten, die nicht auf eine anti-VEGF Therapie ansprechen indiziert, so lange die zentrale neurosensorische Netzhaut noch gut erhalten ist. Auch Augen mit frischen Einrissen des retinalen Pigmentepithels oder frische Pigmentepithelunterblutungen, ggf. mit Durchbruch nach subretinal, weisen meist noch eine gut erhaltene neurosensorische Netzhaut auf und können somit von einer autologen RPE-Chorioidea Translokation profitieren. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass es möglich ist, die Aderhautschicht eines RPE-Chorioidea Translokates mit einem Plasmaskalpell kontrolliert und sicher auszudünnen. Weitere klinisch experimentelle Fallserien müssen nun zeigen, ob die auf diese Weise modifizierten Translokate durch eine

verbesserte nutritive Versorgung in der Frühphase nach der Translokation eine bessere postoperative Funktion aufweisen und diese längerfristig aufrecht erhalten können.

5. Zusammenfassung

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist die häufigste Ursache für einen Verlust der zentralen Sehschärfe bis hin zur Erblindung im Sinne des Gesetzes in den westlichen Industrienationen. Die heutigen Behandlungsoptionen der exsudativen AMD umfassen die konventionelle Laserkoagulation, die photodynamische Therapie und seit kurzem die intravitreale Blockade von VEGF („vascular endothelial growth factor“). Allen diesen Strategien ist gemeinsam, dass sie nur den Verlauf der Erkrankung modulieren, nicht jedoch die pathologisch veränderte retinale Pigmentepithel (RPE)- und Chorioidea-Schicht als zugrunde liegende Pathologie selbst angehen. Die subfoveale Translokation eines autologen RPE-Chorioidea Zellverbandes könnte dagegen einen potentiell kurativen Behandlungsansatz darstellen. Erste klinische Ergebnisse zeigen, dass dieses Verfahren vergleichsweise komplikationsarm durchführbar ist und postoperativ eine retinale Lichtempfindlichkeit und Fixation auf dem Translokate möglich ist. Jedoch bleibt der postoperative Visus in der Regel auf einem niedrigen Niveau und oft wird eine Degeneration der neurosensorischen Netzhaut über dem Translokate beobachtet. Dies könnte durch eine temporäre Hypoxie der Netzhaut in der Zeit bis zur Revaskularisation des RPE-Chorioidea Translokates bedingt sein, da die Netzhaut über dem Translokate in dieser Zeitspanne nur durch Diffusion aus dem intakten, tiefer gelegenen chorioidalem Gewebe des Empfängerbettes ernährt wird. Eine Ausdünnung der Chorioidea-Schicht des Translokates könnte die Diffusion und damit den Nähr- und Sauerstoff-Transport in dieser Zeit verbessern.

Ziel dieser Arbeit war es daher, zu überprüfen, ob eine Ausdünnung der Chorioidea-Schicht eines RPE-Chorioidea Translokates mit dem PEAK-FC (Pulsed Electron Avalanche Knife) Plasmaskalpelle mikrochirurgisch exakt möglich ist und mit welchen Parameter die Intensität des Gewebeabtrages am besten zu variieren und zu kontrollieren ist. Hierzu wurden aus Schweineaugen RPE-Chorioidea Transplantate präpariert und mit dem Plasmaskalpelle bearbeitet. Die Analyse des Gewebeabtrags erfolgte am histologischen Paraffinschnitt und mittels Rasterelektronenmikroskopie.

Hierbei zeigte sich, dass der Gewebeabtrag mit den Parametern „Amplitude der Spannung“ am Plasmaskalpell sowie „Abstand vom Präparat“ linear gesteigert und gut kontrolliert werden kann. Der Parameter „Dauer der Plasmaeinwirkung“ hatte dagegen in einem Zeitraum von zwei bis acht Sekunden keinen Einfluß auf die Abtragungstiefe. Dies schützte vor einem ungewollt tiefen Gewebeabtrag bei zu langem Verharren auf einem Areal des Translokates. Die Parameter „Pulse pro Stoß“, „Pulsweite“ und „Pulsfrequenz“ mussten auf Ihre maximalen Werte eingestellt werden, um einen kontinuierlichen Abtrag zu erreichen. Die intraoperativ visuell geschätzte Tiefe des Gewebeabtrags stimmte gut mit dem histologisch kontrollierten Gewebeabtrag überein. Thermische Kollateralschäden im unmittelbar angrenzenden Gewebe wurden histologisch nicht beobachtet.

Die in dieser Arbeit aufgeführten Daten zeigen, dass mit dem PEAK-FC Plasmaskalpell eine sichere und mikrochirurgisch kontrollierte chorioidale Gewebeabtragung möglich ist. In weiteren tierexperimentellen und klinischen Fallserien muss nun gezeigt werden, ob die intraoperative Ausdünnung der Chorioideaschicht eines autologen RPE-Chorioidea Translokates die postoperative Degeneration der zentralen neurosensorischen Netzhaut verhindern kann und dadurch die postoperative visuelle Funktion verbessert werden kann.

6. Literaturverzeichnis

Aisenbrey S., Lafaut B.A., Szurman P. (2002): Macular translocation with 360 degrees retinotomy for exudative age related macular degeneration. Arch Ophthalmol 120, 451–459

Algvere P.V., Berglin L., Gouras P. (1994): Transplantation of fetal retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration with subfoveal neovascularization. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 232, 707–716

Algvere P.V., Gouras P., Dørgard K.E. (2006): Long-term outcome of RPE allografts in non immunosuppressed patients with AMD. Eur J Ophthalmol 9, 217–230

Algvere P.V., Berglin L., Gouras P., Sheng Y., Kopp E.D. (1997): Transplantation of RPE in age-related macular degeneration observations in disciform lesions and dry atrophy. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 235, 149–158

Algvere P.V., Berlin L., Gouras P., Sheng Y. (1994): Transplantation of fetal retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration with subfoveal neovascularization. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 232, 707–716

Algvere P.V., Gouras P., Dørgard Kopp E. (1999): Longterm outcome allografts in non-immunosuppressed patients with AMD. Eur J Ophthalmol 9, 217– 230

Binder S., Stolba U., Krebs I. (2002): Transplantation of autologous retinal pigmentepithelium in eyes with foveal neovascularization resulting from age-related macular degeneration: a pilot study. Am J Ophthalmol 133, 215–225

Bindewald A., Roth F., van Meurs J., Holz F.G. (2004): Transplantation von retinalem Pigmentepithel (RPE) nach CNV- Exzision bei altersabhängiger Makuladegeneration. Ophthalmologie 101, 886-894

Bird A.C. (1996): Age-related macular disease. Br J Ophthalmol 80, 1-2

Bressler N.M., Bressler S.B. (1995): Preventative ophthalmology. Age related macular degeneration. *Ophthalmology* 102, 1206-1211

Brody B.L., Roch-Levecq A.C., Gamst A.C., Maclean K., Kaplan R., Brown S.I. (2002): Self-management of age-related macular degeneration and quality of life: a randomized controlled trial. *Arch Ophthalmol* 120, 1477-1483

Chakravarthy U., Soubrane G., Bandello F. (2006): Evolving European guidance on the medical management of neovascular age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 90, 1188–1196

Eagle R.C. Jr. (1984): Mechanismus of maculopathy. *Ophthalmology* 91, 613

Eckardt C. (1996): Surgical removal of submacular neovascularization membranes. *Ophthalmologie* 93, 688–693

Eckardt C., Eckardt U., Conrad H.G. (1999): Macular rotation with and without counter-rotation of the globe in patients with age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 237, 313–325

Fujii G.Y., Juan E. Jr., Sunness J. (2002): Patient selection for macular translocation surgery using the scanning laser ophthalmoscope. *Ophthalmology* 109, 1737–1744

Gass J.D. (1994): Biomicroscopic and histopathologic considerations regarding the feasibility of surgical excision of subfoveal neovascular membranes. *Am J Ophthalmol* 118, 285–298

Grehn F. (2002): *Augenheilkunde*, Springer, Berlin

Hawkins B.S., Bressler N.M., Miskala P.H. (2004): Surgery for subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: ophthalmic findings: SST report no. 11. *Ophthalmology* 111, 1967–1980

Hyman L.G., Liliengeld A.M., Ferris F.L., Fine S.L. (1983): Senile macular degeneration: a case control study. *Am J Epidemiol* 118, 213-227

Hayreh S.S. (1974): Vascular pattern of the choriocapillaris. *Exp Eye Res* 19, 101–104

Hayreh S.S. (1974): Submacular choroidal vascular pattern. Experimental fluorescein fundus angiographic studies. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 192, 181–196

Hisatomi T., Sakamoto T., Goto Y. (2002): Critical role of photoreceptor apoptosis in functional damage after retinal detachment. *Curr Eye Res* 24, 161–172

Holz F.G., Pauleikhoff D. (1997): *Altersabhängige Makuladegeneration*, Springer, Berlin

Holz F.G., Bindewald A., Schutt F., Specht H. (2003): Intraocular microablation of choroidal tissue by a 308 nm AIDA excimer laser for RPE-transplantation in patients with age-related macular degeneration. *Biomed Tech (Berl)* 48(4), 82–85.

Hu Y., Zhang T., Wu J., Li Y., Lu X., Qian F., Yin Z., Ma Z. (2008): Autologous Transplantation of RPE with Partial-Thickness Choroid after Mechanical Debridement of Bruch Membrane in the Rabbit. *IOVS* 49, 7

Jousseaume A.M., Heussen F.M., Joeres S. (2006): Autologous translocation of the choroid and retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 142, 17–30

Jousseaume A.M., Joeres S., Fawzy N. (2007): Autologous translocation of the choroid and retinal pigment epithelium in patients with geographic atrophy. *Ophthalmology* 114, 551–560

Klaver C.C.W., van Leeuwen R., Vingerling J.R., De Jong P. (2003): Epidemiology of age-related maculopathy. In: Holz FG, Pauleikoff D, Spaide RF, Bird AC (Hrsg) *Age related macular degeneration*. Springer, Berlin

Lappas A., Foerster A.M., Weinberger A.W. (2004): Translocation of iris pigment epithelium in patients with exudative age-related macular degeneration: longterm results. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 242, 638–647

Leonhardt H. (1990) *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen Band 3*, Thieme, New York

Maaijwee K.J., van Meurs J.C., Kirchhof B. (2007): Histological evidence for revascularization of an autologous RPE-choroid graft in the pig. *Br J Ophthalmol* 91, 546-550

MacLaren R.E., Bird A.C., Sathia P.J. (2005): Longterm results of submacular surgery combined with macular translocation of the retial pigment epithelium in neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 112, 2081–2087

MacLaren R.E., Uppal G.S., Balaggan K.S. (2007): Autologous transplantation of the retinal pigment epithelium and choroid in the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 114(3), 561–570.

McKeever P.J., Braden T.D. (1978): Comparison of full- and partial-thickness autogenous skin transplantation in dogs: a pilot study. *Am J Vet Res* 39(10), 1706–1709.

Peyman G.A., Blinder K.J., Paris C.L. (1991): A technique for retinal pigment epithelium transplantation for age-related macular degeneration secondary to extensive subfoveal scarring. *Ophthalmic Surg* 22, 102–108

Penfold P.L., Killingsworth M., Sarks S. (1985): Senile macular degeneration: The involvement of immunocompetent cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 223, 69

Putz und Pabst (2000): *Anatomie des Menschen, Band 1, obere Extremität*, Urban & Fischer, Jena

Rosenfeld P.J., Rich R.M., Lalwani G.A. (2006): Ranibizumab: Phase III clinical trial results. *Ophthalmol Clin North Am* 19, 361–372

Schiebler und Schmidt (2002): *Anatomie*, Springer, Berlin

Scholl H.P.N., Fleckenstein M., Charbel Issa P. (2007): An update on the genetics of age-related macular degeneration, *Mol Vis* 13, 196-205

Stanga P.E., Kychenthal A., Fitzke F.W. (2002): Retinal pigment epithelium translocation after choroidal neovascular membrane removal in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 109, 1492–1498

Stanga P.E., Kychenthal A., Fitzke F.W. (2001): Retinal pigment epithelium translocation and central visual function in age related macular degeneration: preliminary results. *Int Ophthalmol* 23(4–6), 297–307

Thomas M.A., Dickinson J.D., Melberg N.S. (1994): Visual results after surgical removal of subfoveal choroidal neovascular membranes. *Ophthalmology* 101, 1384–1396

Thomas M.A., Grand M.G., Williams D.F., Lee C.M., Pesin S.R., Lowe M.A. (1992): Surgical management of subfoveal choroidal neovascularization. *Ophthalmology* 99, 952–968

Treumer F., Bunse A., Klatt C., Roider J. (2007): Autologous retinal pigment epithelium-choroid sheet transplantation in age related macular degeneration: morphological and functional results. *Br J Ophthalmol* 91(3), 349–353

Trauzettel-Klosinski S. (2003): Reading with AMD. In: Holz FG, Pauleikhoff D, Spaide RF, Bird AC (Hrsg) *Age-related macular degeneration*. Springer, Berlin

van Meurs J.C., Hofland L.J. (2004): Autologous peripheral retinal pigment epithelium translocation in patients with subfoveal neovascular membranes. *Br J Ophthalmol* 88, 110-113

van Meurs J.C., van den Biesen P.R. (2003): Autologous retinal pigment epithelium and choroid translocation in patients with exudative age-related macular degeneration: short-term follow-up. *Am J Ophthalmol* 136, 688–695

von Ruckmann A., Fitzke F.W., Bird A.C. (1999): Distribution of pigment epithelium autofluorescence in retinal disease state recorded in vivo and its change over time. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 237, 1–9

Wovner B.W., Casten R.J., Tasman W.S. (2002): Effect of depression on vision function in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 120, 1041-1044

Yang L., Bula D., Arroyo J.G. (2004): Preventing retinal detachment-associated photoreceptor cell loss in Bax-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 648–654

Yepez J.B., Arevalo J.F. (2003): RPE translocation in ARMD. *Ophthalmology* 110(11), 2262

Young R.W. (1987): Pathophysiology of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 31, 291

7. Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater Prof. J. Roider bedanken, für das entgegengebrachte Vertrauen mir diese Forschungsarbeit zu überlassen und die großzügige Bereitstellung der technischen und räumlichen Mittel, um die Experimente und Laboruntersuchungen durchführen zu können. Vor allem möchte ich ausdrücklich für die Förderung meiner Person danken, die unter anderem das Stipendium zur Teilnahme an der Wissenschaftsolympiade in Moskau einschließt.

Ein weiteres Dankeschön gilt meinem Betreuer Dr. Bunse, der mich vom ersten Nadelstich in der Retina bis hin zu Meisterung von Stresssituationen viel gelehrt hat.

Ich danke sehr herzlich Herrn Dr. Treumer, der die Betreuung meiner Arbeit, nach klinikinternen Veränderungen, übernommen hat für seine freundschaftliche, unkomplizierte und ausdauernde Hilfe. Seine Motivation und Erfahrung haben mich immer an eine Lösung für jedes Problem glauben lassen.

Ich möchte mich sehr herzlich bei Frau Markwardt und Frau Luick bedanken, die mich angeleitet haben und mein Arbeiten im Labor möglich gemacht haben.

Ich danke dem Anatomischen Institut Kiel für die professionelle Zusammenarbeit und die Bereitstellung des Rasterelektronenmikroskops für meine Dienste.

Ich danke Dr. Eva-Maria Sattler für ihre Unterstützung, sowie das Korrekturlesen der Arbeit.

Ich danke Dr. Helga E. Nagel und Thomas Nagel, für die bedingungslose familiäre Unterstützung.

8. Lebenslauf

Name: Benjamin Sattler

Geburtsdatum: 02. Oktober 1979

Geburtsort: Bonn, Deutschland

Nationalität: Deutsch

Sprachen: deutsch, englisch, spanisch

Schulbildung

1986-1990 Katholische Grundschule, Wachtberg-Pech

1990-1999 Pädagogium Otto-Kühne-Schule, Bad Godesberg

29. Mai 1999 Allgemeine Hochschulreife

Bundeswehr

1. November 1999 - 31. August 2000, Wachbatallion, BMVg, Siegburg

Rettungsdienst

23. August 2002 staatliche Prüfung zum Rettungssanitäter, Malteser Hilfsdienst e.V. Bonn

Universität

2002 bis 2004 Martin-Luther-Universität zu Halle

30. März 2004 1. Staatsexamen (Physikum)

2004 bis 2008 Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

03. Juni 2008 Approbation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Februar 2005 - Januar 2009 Dissertation (Ophtalmologie, UK-SH, Campus Kiel) zum Thema:

RPE-CHORIOIDEA TRANSPLANTATION BEI ALTERSBEDINGTER MAKULADEGENERATION.

UNTERSUCHUNGEN ZUR PLASMASKALPELL-GESTÜTZTEN ABTRAGUNG VON CHORIOIDEA AM SCHWEINEBULBUS

Famulaturen

Kardiochirurgie, Prof. Dr. med. J. Cremer, Christian-Albrechts-Chirurgie zu Kiel

Plastische Chirurgie, Prof. Dr. med. Ivo Pytanguy, General Hospital of Rio de Janeiro, Brasilien

Gastroenterologie, Prof. Dr. med T. Sauerbruch, Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität zu Bonn

Ophtalmologie, Prof. Dr. J. Roider, Christian-Albrechts-Chirurgie zu Kiel

Oto-Rhino-Laryngologie, Kopf-Halschirurgie, Dr. M. Dobozi, Zürich, Schweiz

Wissenschaftliche Vorträge

RPE-Sheet transplantation and modifikation with plasmaknife for exsudative AMD,

Wissenschaftsolympiade, I. M. Setschenov, Russland

RPE-Sheet transplantation and modifikation with plasmaknife for exsudative AMD,

Department for Ophtalmologie, Setschenov University Moskau, Russland

Stipendien

Stipendium zur Teilnahme an der Wissenschaftsolympiade zur Präsentation der Dissertation,
I. M. Setschenov Moskau, Russland

Auslandsaufenthalte

1999 Juni-September, Sprachkurs, Mallorca, Spanien

2000 August-Oktober, Sprachkurs, Barcelona, Spanien

2004 September, Sprachreise, Sao Paulo, Brasilien

2006 März, Kopf-Hals-Chirurgie ORL, Zürich, Schweiz

2007 Februar-Juli, Kopf-Hals-Chirurgie ORL, Barcelona, Spanien