

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

## **Einfluss von Silikonöltamponaden auf retinale Mikroglia in vitro**

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

vorgelegt von  
Antonia Marie-Luise Harms  
aus Bad Oldesloe

Kiel, 2021

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. Alexa Karina Klettner

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. Dr. Janka Held-Feindt

Tag der mündlichen Prüfung: 13.05.2022

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 03.02.2022

gez.: Prof. Dr. Alexa Karina Klettner  
(Vorsitzende der Prüfungskommission)

## **Inhaltsverzeichnis**

I. Abkürzungsverzeichnis .....	III
1. Einleitung .....	1
1.1 Grundlagen .....	1
1.2 Bedeutung, Epidemiologie, Klinik der Netzhautablösung .....	1
1.3 Indikation und Komplikationen der Silikonöltamponade .....	2
1.4 Sehverluste unter Silikonöl .....	4
1.5 Rolle der Mikroglia in ZNS und Retina .....	5
1.6 Zytokine.....	8
1.6.1 IL-6.....	8
1.6.2 IL-8.....	9
1.6.3 IL-1 $\beta$ .....	9
1.6.4 TNF- $\alpha$ .....	10
1.7 Fragestellung der Arbeit .....	10
2. Material und Methoden .....	11
2.1 Materialliste.....	11
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	11
2.1.2 Enzyme .....	12
2.1.3 Zellkulturmedien .....	12
2.1.4 Lösungen.....	13
2.1.5 Antikörper.....	13
2.1.6 Eingesetzte Materialien zur Stimulation oder Differenzierung.....	13
2.1.7 ELISA .....	13
2.1.8 Sonstige Substanzen.....	14
2.1.9 Verbrauchsmaterialien .....	14
2.1.10 Geräte.....	15
2.1.11 Software Programme, Layout .....	16
2.2 Methoden.....	16
2.2.1. Präparation, Kultivierung, Ernte und Nachweis retinaler Mikroglia .....	16
2.2.1.2 Ernte und Bestimmung der Zellzahl der retinalen Mikroglia .....	17
2.2.1.3 Grundlegender Versuchsaufbau .....	18
2.2.1.4 Immunzytochemie Iba-1 .....	19
2.2.2 Herkunft, Kultivierung und Differenzierung der PC12-Zellen.....	20
2.2.2.1 Herkunft und Kultivierung der PC12-Zellen .....	20
2.2.2.2 Kollagenbeschichtung der Kulturschalen.....	21
2.2.2.3 Vermehrung der PC12-Zellen .....	21

2.2.2.4 Differenzierung der PC12-Zellen.....	22
2.2.3 Eigenschaften des verwendeten Silikonöls .....	22
2.2.4 Emulsionsbildung von Silikonöl.....	22
2.2.5 Coomassie-Färbung .....	24
2.2.6 Morphologie der Mikroglia.....	24
2.2.7 Silikon-Einschlüsse der Mikroglia.....	26
2.2.8 MTT-Assay .....	27
2.2.9 WST-1-Assay .....	27
2.2.10 ELISA .....	28
2.2.11 Statistik .....	29
3. Ergebnisse .....	30
3.1 Nachweis der Mikroglia .....	30
3.2 Größenverteilung der Mikroglia .....	31
3.2.1 Größenverteilung der Mikroglia nach 24 Stunden.....	31
3.2.2 Größenverteilung der Mikroglia nach SÖ für 24 Stunden .....	32
3.2.3 Größenverteilung der Mikroglia nach SÖ für 48 Stunden .....	32
3.2.4 Größenverteilung der Mikroglia nach SÖ für 72 Stunden .....	32
3.3 Vitalitätstestung von Silikonöl auf retinale Mikroglia .....	33
3.4 Aufnahme von Silikonöl durch retinale Mikroglia .....	34
3.5 Sekretion von Zytokinen durch retinale Mikroglia nach Silikonöl-Exposition .....	36
3.5.1 IL-6.....	36
3.5.2 IL-8.....	37
3.5.3 IL-1 $\beta$ .....	38
3.5.4 TNF- $\alpha$ .....	39
3.6 Neurotoxizität durch Mikroglia-Überstände nach 10% SÖ .....	39
4. Diskussion .....	41
4.1 Vorbemerkung.....	41
4.2 Folgen der Interaktion von Silikonöl mit den retinalen Mikroglia .....	41
4.3 Toxizität auf neuronale Zellen durch silikonbehandelte Mikroglia-Überstände .....	44
5. Zusammenfassung.....	47
6. Literaturverzeichnis .....	49
7. Anhang.....	60
7.1 Abbildungsverzeichnis .....	60
7.2 Danksagung .....	60
7.3 Lebenslauf .....	61
7.4 Veröffentlichung .....	61

## I. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
BCVA	<i>best corrected visual acuity</i> , bestkorrigierte Sehschärfe
°C	Grad Celsius
cm	Centimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CO	Kohlenstoffmonoxid
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> , chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CR	Komplement-Rezeptor
DMEM	<i>Dulbecco´s modified Eagle Serum</i> (Nährmedium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent</i> , enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
fcR	Fc-Rezeptor
g	Gramm
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl) -ethansulfonsäure
HDL	<i>high-density lipoprotein</i> , Lipoprotein hoher Dichte
Iba-1	<i>ionized calcium-binding adapter molecule 1</i> , ionisiertes Calcium-bindendes Adapterprotein 1
IL-1β	Interleukin 1 beta
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
KO	Kontrolle
logMar	<i>Logarithm oft the Minimum Angle of Resolution</i> , Logarithmus des minimalen Auflösungswinkels

MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
$\mu\text{l}$	Microliter
$\mu\text{m}$	Micrometer
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NGF	<i>Neuronal Growth Factor</i> , neuronaler Wachstumsfaktor
nm	Nanometer
p	mathematische Wahrscheinlichkeit eines Ereignisses
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
pg	Picogramm
Poly I :C	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i> , Polyinosinsäure:Polycytidylsäure
RPE	retinales Pigmentepithel
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> , Nährmedium
SÖ	Silikonöl
SOF	Subsilicone oil fluid, Flüssigkeit unter dem Silikonöl
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
WST-1	<i>Water-soluuable tetrazolium-1</i> , wasserlösliches Tetrazolium-1

## **1. Einleitung**

### **1.1 Grundlagen**

Das Auge ist ein höchstkomplexes Organ zur Wahrnehmung sensorischer Reize und kann elektromagnetische Wellen von ca. 350 bis 750 nm wahrnehmen (Sachsenweger und Klauß 2003; Grehn 2012). Die innerste Schicht des Auges wird durch die Netzhaut (Retina) gebildet. Sie gehört entwicklungstechnisch und auch funktionell zum Gehirn (Lüllmann-Rauch 2015). Die Retina wird aus einem komplexen Zusammenspiel unterschiedlichster Zellen wie Neuronen, Interneuronen und Gliazellen wie den retinalen Mikroglia gebildet (Lüllmann-Rauch 2015). Auf die retinalen Mikroglia als Immun- und Fresszellen der Retina wird aufgrund ihrer zentralen Bedeutung für diese Arbeit noch im Abschnitt 1.6 ausführlich eingegangen. Traditionell wird die Retina in zehn Schichten unterteilt. Dabei durchdringen die Lichtstrahlen die Hornhaut, die Linse, den Glaskörper und bilden ein verkleinertes, umgekehrtes Abbild auf der Retina ab (Sachsenweger und Klauß 2003). Die äußerste Schicht der Retina wird aus dem retinalen Pigmentepithel (RPE) gebildet. Das RPE hat zahlreiche Aufgaben hinsichtlich der Steuerung von Stoffwechselvorgängen, Transportfunktionen und zum Aufbau der Blut-Retina-Schranke (Lüllmann-Rauch 2015). Die innerste Schicht der Retina grenzt an den Glaskörper (Corpus vitreum). Der Glaskörper ist eine visköse gelatinöse Substanz (Lüllmann-Rauch 2015). Er soll die Form des Bulbus stabilisieren und Netzhautablösungen entgegenwirken (Lüllmann-Rauch 2015).

### **1.2 Bedeutung, Epidemiologie, Klinik der Netzhautablösung**

Unter dem Begriff „Netzhautablösung“ versteht man die Trennung der neurosensorischen Retina vom versorgenden RPE. Durch die Trennung vom RPE kann es zur irreversiblen Degeneration und zum Absterben der ischämischen Retina kommen (Ghazi und Green 2002). So kann die Netzhautablösung bei fehlender oder insuffizienter Behandlung zu Sehverlusten bis zur kompletten Erblindung führen (Bechrakis und Dimmer 2018). Aus diesem Grund zählt die Netzhautablösung zu einem der wichtigsten Notfälle in der Augenheilkunde (Bechrakis und Dimmer 2018). Eine rechtzeitige Therapie ist für einen Behandlungserfolg und das Wohlbefinden der Patienten von größter Wichtigkeit (Morescalchi et al. 2014). Man unterscheidet die rissbedingte (rhegmatogene), zugbedingte (traktive) und flüssigkeitsbedingte (exsudative) Netzhautablösung sowie einzelne Sonderformen (Ghazi und Green 2002). Mit einer Inzidenz von 6-8 Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr tritt die rissbedingte Form am häufigsten auf. Bedeutende Risikofaktoren sind das steigende Alter, das männliche Geschlecht,

eine hohe Myopie und der Zustand nach Kataraktoperation (Bechrakis und Dimmer 2018). Zu den möglichen Symptomen der Netzhautablösung gehören Visusminderung, Gesichtsfeldausfälle, Rußregen (dunkle Punkte, die sich regenartig bzw. wie aufsteigender Rauch in das Gesichtsfeld schieben), *floater* (Punkte, Flecken, fadenartige Strukturen im Gesichtsfeld), Photopsien (Lichtblitze) oder Metamorphopsien (verzerrte Wahrnehmung) (Steel 2014).

### **1.3 Indikation und Komplikationen der Silikonöltamponade**

Das Ziel der Therapie von Netzhautablösungen ist die Wiederanlage der Retina an das RPE um die Versorgung der Retina sicherzustellen. Je nach Befund wird die Netzhautablösung mit Kryopexie, Laserkoagulation, Cerclage (eindrückendes Band um die Sklera) oder per Glaskörperoperation (Vitrektomie) behandelt (Ghazi und Green 2002). Die Vitrektomie ist ein operatives Verfahren unter retrobulbärer, lokaler oder allgemeiner Anästhesie zur Entfernung des Glaskörpers (Feltgen und Walter 2014). Aufgrund der anatomischen Gegebenheiten eignet sich besonders der Bereich der Pars-plana zur Eröffnung des Augapfels. Dazu werden über kleine Inzisionen drei Zugänge zur Einführung der chirurgischen Instrumente wie dem Saugschneidegerät (Vitrektom), der Lichtquelle und der Spüldrainage zur Aufrechterhaltung des okulären Druckes benötigt (Feltgen und Walter 2014). Die einzelnen Operationsschritte werden unter Sicht durch ein Mikroskop durchgeführt (Sachsenweger und Klauß 2003). Stark vereinfacht wird während des Eingriffs mithilfe des Saugschneidegerätes der Glaskörper aus dem Auge entfernt. Anschließend wird die subretinale Flüssigkeit unter Verwendung einer schweren Tamponade (Perfluordekalin oder Perfluorcarbon) verdrängt. Im nächsten Schritt wird das Netzhautloch mithilfe der Kyropexie oder Laser behandelt. Abschließend wird der Augeninhalt durch eine passende Tamponade ersetzt (Feltgen und Walter 2014). Zur internen Tamponade eignen sich Ringerlösung, Perfluorcarbone, Gase oder Silikonöle. Die Vitrektomie ist vermehrt indiziert bei Netzhautablösungen im Rahmen von Glaskörperveränderungen, Traumata oder vitreoretinalen Proliferationen (Sachsenweger und Klauß 2003).

Gegenstand dieser Arbeit ist die Verwendung von Silikonöl (SÖ) als Endotamponade. Seitdem 1962 das Silikonöl erstmalig im Bereich der Netzhautchirurgie angewandt wurde (Cibis et al. 1962), entwickelte sich die Silikonöltamponade seit den frühen 1980ern zu einem gängigen Verfahren in der Augenheilkunde (Morescalchi et al. 2014). Aufgrund der Oberflächenspannung, der Volumenverdrängung und der Schwimmkraft sind klassische Silikonöle besonders zur Tamponade der superioren Retina geeignet (Russo et al. 2018).

Neuere, so genannte „schwere“ Silikonöle sollen aufgrund veränderter Eigenschaften vermehrt zur Therapie von Netzhautablösungen der inferioren Retina geeignet sein (Russo et al. 2018). Zu den Indikationen von Silikonöltamponaden gehören proliferative Vitreoretinopathien (Schwartz et al. 2014) oder komplizierte Retinaablösungen (Shen und Yang 2007). Unter dem Begriff der komplizierten Retinaablösung werden Krankengeschichten mit Traumata und okulären Fremdkörpern (Szurman et al. 2007), mit multifokalen oder großflächigen Auftreten, oder bei Grunderkrankungen wie einer diabetischen Retinopathie gefasst (Yamamoto und Takeuchi 2000). Zusammenfassend sind Silikonöltamponaden im Allgemeinen vermehrt bei komplexen Krankengeschichten indiziert. Dennoch empfehlen einige Autoren die Anwendung von Silikonöltamponaden bereits bei primär unkomplizierten Fallgeschichten (Antoun et al. 2016; Schurmans et al. 2009). Auch wenn Patienten frühzeitig mit dem Flugzeug fliegen müssen oder aufgrund des Alters die Einhaltung der korrekten postoperativen Lagerung nicht sichergestellt werden kann, wird primär mit Silikonöltamponaden therapiert (Barca et al. 2014). Toxische Auswirkungen der klassischen Silikonöle wurden lange diskutiert. In der Vergangenheit kamen Autoren zu kontroversen Studienergebnissen (Constable et al. 1982; Ober et al. 1983). Aktuell wird keine direkte Toxizität auf das umliegende Gewebe angenommen (Inoue et al. 2009). Aufgrund der Stabilität, der immunologischen Toleranz und der fehlenden direkten Toxizität gilt Silikonöl somit als ein geeignetes Material zur Endotamponade (Morescalchi et al. 2014; Lucke et al. 1987; Inoue et al. 2009). Trotz dieser Aspekte und der allgemein guten Verträglichkeit sind zahlreiche Komplikationen dieses Therapieverfahrens bekannt. Zu einer der häufigsten Komplikationen zählt die Entstehung oder Progression eines Katarakts (Issa et al. 2019). Daneben kann es zu einer Erhöhung des Augeninnendrucks (Jabbour et al. 2018), zur Entwicklung eines Glaukoms (Ichhpujani et al. 2009) oder zur Ausbildung einer Keratopathie kommen (Miller et al. 2014). Auch die Entstehung von Zysten oder eine Infiltration des Silikonöls in das lokale Gewebe bis in Abschnitte des Gehirns wird beschrieben (Grzybowski et al. 2014; Federman und Schubert 1988). In der Literatur wird ebenfalls das Auftreten von zentralen Sehverluste bei Therapie mit Silikonöltamponaden erwähnt. Dieses Phänomen wird im Abschnitt 1.5 näher betrachtet. Um das Risiko für die Entstehung der Langzeitkomplikationen zu minimieren, wird heutzutage eine zeitige Operation zur Entfernung des Silikonöls nach wenigen Monaten empfohlen (Light 2006).

## **1.4 Sehverluste unter Silikonöl**

Neben den bereits beschriebenen Komplikationen der Therapie fielen in einzelnen Studien Sehverluste auf, die sowohl vor (Herbert et al. 2006) als auch nach der Entfernung der Silikonöltamponade auftraten (Moya et al. 2015; Roca et al. 2017). Dabei handelt es sich um ein nicht zu unterschätzendes Phänomen. Nach aktueller Studienlage sind bis zu 20-30% der Patienten mit Silikonöltamponaden von irreversiblen Sehverlusten unbekannter Ursache betroffen (Christensen und La Cour 2012; Tode et al. 2016; Scheerlinck et al. 2016). Tode et al. beschrieben den Sehverlust als eine dauerhafte Verschlechterung der bestkorrigierten Sehschärfe (*best corrected visual acuity, BCVA*) mit zentralen Gesichtsfeldausfällen. Im Durchschnitt lag die bestkorrigierte Sehschärfe dieser Patientengruppe präoperativ bei 0,15 und postoperativ bei 1,0 logMAR (Tode et al. 2016). Scheerlinck et al. definiert den Sehverlust als eine Verschlechterung der bestkorrigierten Sehschärfe um  $< 2$  Snellen-Linien. Die bestkorrigierte Sehschärfe dieses Patientenkollektivs lag präoperativ bei 0,05 und postoperativ bei 1,00 logMAR (Scheerlinck et al. 2016). Diese Sehverluste können für die Betroffenen weitreichende Folgen im sozialen und gesellschaftlichen Leben haben. Als Verlust einer fundamentalen Sinnesqualität belastet ein Sehverlust die Lebensqualität und psychische Verfassung stark (Senra et al. 2015). Um das Auftreten dieser Komplikation zu verstehen und zu vermeiden, ist die Kenntnis des Pathomechanismus entscheidend. Aktuell ist die Ursache der Sehverluste noch ungeklärt. Zahlreiche Variablen können die Entstehung von Sehverlusten beeinflussen (Tode et al. 2016). Zur Minimierung dieser Variablen untersuchten Tode et al. ein möglichst homogenes Patientenkollektiv mit Netzhautablösungen ohne Beteiligung der Makula. In dieser Studie entwickelte sich der Sehverlust bei allen Patienten vor Entfernung des Silikonöls und trat nach den ersten 3 postoperativen Monaten auf (Tode et al. 2016). Weder während der Operation, noch im Verlauf der Kontrolluntersuchungen konnte eine ausreichende Erklärung gefunden werden. Allerdings fielen Tode et al. eine Assoziation der Sehverluste mit einer signifikanten Verringerung der Retinadicke auf. Besonders betroffen waren die Nervenfaserschicht, die Ganglienzellschicht und die innere plexiforme Schicht im fovealen und parafovealen Bereich (Tode et al. 2016). Auch Christensen et al. berichteten über eine Abnahme der inneren Retinaschichten (Christensen und La Cour 2012). Die Verringerung könnte durch den Zelluntergang von Ganglienzellen im betroffenen Auge bedingt sein (Tode et al. 2016). Andere Autoren versuchten das Auftreten der Sehverluste durch eine intraoperative Fototoxizität während der Silikonölfrembung (Dogramaci et al. 2013), eine intraoperative Perfusionsstörungen der Retina (Cazabon et al. 2005) oder eine Zunahme der Konzentrationen

von Wachstumsfaktoren und Zytokinen zu erklären (Asaria et al. 2004; Cazabon et al. 2005). Mrejen et al. erwähnten eine Assoziation von Silikoneinlagerungen in die Netzhaut und in den Sehnerven mit den Sehverlusten (Mrejen et al. 2014). Silikonöl konnte zudem in anderen Geweben wie Trabekelwerk, Vorderkammer oder in seltenen Fällen selbst in intrakranialen Strukturen nachgewiesen werden (Eckle et al. 2005; Odrobina und Laudańska-Olszewska 2014). In diesem Zusammenhang scheint die Emulsionsbildung von Silikonöl von großem Interesse zu sein. Die Emulsionsbildung des Silikonöls im menschlichen Auge ist von zahlreichen Aspekten abhängig. Neben physikalischen und chemischen Eigenschaften des verwendeten Silikonöls (Nakamura et al. 1990) sollen besonders durch Kopf- und Augenbewegungen provozierte Scherkräfte eine Emulsionsentstehung fördern (Chan et al. 2014; Federman und Schubert 1988). Während der Vorgang bis zu einem gewissen Punkt reversibel ist, begünstigen bestimmte Blutbestandteile und inflammatorische Proteine die Entstehung einer permanenten Emulsion (Morescalchi et al. 2014). Als emulsionsfördernd wirken unter anderem die Oberflächenproteine der Erythrozyten, Plasmalipoproteine und Lipoproteine hoher Dichte (high density lipoprotein, HDL) (Savion et al. 1996). Emulgiertes Silikonöl wird verdächtigt ein Trigger für die Entstehung von Entzündungsvorgängen zu sein und die Phagozytoserate und Chemotaxis von Entzündungszellen zu erhöhen (Morescalchi et al. 2014; Kociok et al. 2005).

Zusammenfassend sind die Silikonöl-assoziierten Sehverluste unbekannter Ursache eine wichtige Komplikation für bis zu 30% der Patienten. Aufgrund der weitreichenden Auswirkungen auf das Leben der Betroffenen ist eine Erforschung des auslösenden Pathomechanismus von großem Interesse. Aktuell werden verschiedenste Pathomechanismen diskutiert. Roider stellte mit der Annahme einer potentiellen immunologischen Reaktion der retinalen Mikroglia eine weitere Hypothese auf (Roider 2016). Emulgiertes Silikonöl könnte durch die als Fress- und Immunzellen fungierenden Mikroglia aufgenommen werden. Die Aufnahme und längerfristige Exposition des Silikonöls könnten dann zu einer chronischen Aktivierung der Zellen mit pathologischen Folgen führen.

## **1.5 Rolle der Mikroglia in ZNS und Retina**

Das Auge mit der Retina ist zum Schutz vor exogenen und endogenen Reizen mit einem besonderen Immunprivileg ausgestattet (Chen und Xu 2015). Dieses Immunprivileg ist aufgrund der eingeschränkten Regenerationsfähigkeit der Retina von großer Bedeutung, da eine adaptive Immunantwort und die Aktivierung der T-Zellen zu gravierenden Schäden wie

irreversiblen Sehverlusten führen könnte (Forrester und Xu 2012; Pleyer und Pohlmann 2017; Streilein 2003). In der Immunabwehr der Retina nehmen die retinalen Mikroglia als mononukleäre Phagozyten und Abwehrzellen des Zentralnervensystems eine bedeutende Rolle ein (Boche et al. 2013).

Die retinalen Mikroglia entwickeln sich aus dem Dottersack und wandern während der Embryogenese in die Retina ein (Silverman und Wong 2018). Dort erhalten sie, abgeschirmt durch die Blut-Retina-Barriere, ihre residente Population aufrecht (Silverman und Wong 2018). Im physiologischen Zustand der Retina besiedeln die Mikroglia besonders die innere und die äußere plexiforme Schicht (Karlstetter et al. 2010). Im aktivierte Zustand breiten sich die Zellen auch vermehrt in den Körnerschichten und im subretinalen Raum aus (Karlstetter et al. 2010). Hinsichtlich ihrer Funktion als immunkompetente und Antigen-präsentierende Zellen sind Mikroglia mit den Antigenen der Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) I und II, *Toll-like* Rezeptoren, Komplement-Rezeptoren (CR), Fc-Rezeptoren (FcR), *Scavenger*-Rezeptoren (Fress-Rezeptoren) sowie Zytokin-Rezeptoren ausgestattet (Streit 2002; Karlstetter et al. 2015).

Mikroglia können in unterschiedlichen Aktivitätsformen vorliegen. Im gesunden ZNS wirken die Mikroglia in der sogenannten „ruhenden“ Form neuroprotektiv und antiinflammatorisch (Streit 2002). Entgegen der Implikation einer „ruhenden Zelle“ sind Mikroglia auch in diesem Zustand aktiv. Sie kommunizieren fortlaufend mit anderen Gliazellen wie den Müller-Zellen oder mit neuronalen Zellen (Silverman und Wong 2018). Auf diese Weise können sie die Ausbildung von Synapsen, das synaptische *Remodeling* und die neuronale Plastizität beeinflussen (Li et al. 2015; Karlstetter et al. 2015). Mikroglia sind im ruhenden Zustand durch kleine Zellkörper mit zahlreichen zarten Ausläufern charakterisiert. Diese Ausläufer sind beweglich und kontrollieren kontinuierlich ihre Umgebung. Innerhalb kürzester Zeit kann so die gesamte Retina überwacht und von metabolischen Abfallprodukten oder Zellresten gereinigt werden (Nimmerjahn et al. 2005; Graeber und Streit 2010; Karlstetter et al. 2015; Li et al. 2015). Zusammenfassend stellen die ruhenden Mikroglia eine aktive Zellpopulation mit vielfältigen Aufgaben, welche von großer Wichtigkeit für die Unterstützung der retinalen Integrität und Homöostase sind, dar (Li et al. 2015).

Bei Gefährdung der okulären Homöostase durch pathologische Reize können die ruhenden Mikroglia in eine aktivierte Form übergehen (Streit 2002; Li et al. 2015). Im Rahmen der Aktivierung verändert sich die Zelle innerhalb kürzester Zeit sowohl morphologisch als auch funktionell (Streit 2002; Li et al. 2015). Morphologisch fällt der Verlust der Ausläufer und der

Übergang in die amöboide Form auf (Boche et al. 2013). Funktionell kann durch die Aktivierung die Proliferations- und die Phagozytoserate der Mikroglia gesteigert werden (Langmann 2007). Die Zelle kann sich verbessert im Gewebe bewegen. Die Produktion von zahlreichen bioaktiven Molekülen wie Stickstoffmonoxid sowie proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Prostaglandinen kann erhöht werden (Langmann 2007; Nakamura 2002). Die Aktivierung der Mikroglia kann mit einem zweischneidigen Schwert verglichen werden. Im akuten Fall dient die zeitlich begrenzte Aktivierung mit Inflammation der Regeneration und Neuroprotektion (Rashid et al. 2019; Zhao et al. 2015). Dies geschieht beispielsweise über die Beseitigung von Abfallstoffen und über die Sekretion von neuronalen Überlebensfaktoren (Li et al. 2015). Bei einem chronischen Reiz können die Mikroglia jedoch in einem pathologisch aktivierte Zustand verbleiben (Rashid et al. 2019). Die chronische Aktivierung kann zu einer verstärkten Sekretion proinflammatorischer Zytokine führen (Rashid et al. 2019). Diese Überproduktion von Zytokinen kann auf Neurone degenerativ bzw. toxisch wirken (Graeber und Streit 2010; Cherry et al. 2014; Madeira et al. 2015; Hanisch und Kettenmann 2007). So gleicht die chronische Aktivierung einem Circulus vitiosus aus persistierender Aktivierung, unkontrollierter Inflammation und fortlaufendem Gewebsuntergang (Rashid et al. 2019; Zhao et al. 2015; Li et al. 2015).

Heutzutage wird eine Beteiligung dieser Zellen an verschiedensten degenerativen Erkrankungen der Retina wie dem Glaukom, der Retinitis pigmentosa und der altersbedingten Makuladegeneration angenommen (Silverman und Wong 2018). Ob die retinalen Mikroglia eine Rolle in dem Pathomechanismus der Sehverluste nach Silikonöltamponade spielen, ist noch unklar. Die Aufnahme von Silikonöl wurde bisher nur für die blutstättigen Phagozyten gezeigt und dient als Erklärung für das Auffinden von Silikonöl in Geweben wie der Retina, dem Sehnerven und dem Gehirn (Budde et al. 2001; Eckardt et al. 1993; Papp et al. 2004). Diese blutstättigen Makrophagen waren proinflammatorisch aktiviert und besonders in epiretinalen Membranen der behandelten Augen lokalisiert (Wickham et al. 2007; Betis et al. 2003). Da in der Retina unter physiologischen Bedingungen keine blutstättigen Makrophagen resident sind, sondern Mikroglia die Rolle der Phagozyten der Retina ausüben, ist eine Untersuchung ihrer Reaktion auf das Silikonöl von möglicher hoher Relevanz zur Ableitung weiterer Erkenntnisse. Soweit ersichtlich gibt es noch keine Studie zu dieser Thematik.

## **1.6 Zytokine**

Zytokine dienen als lösliche Botenstoffe der Kommunikation zwischen den Zellen. Sie kontrollieren eine Vielzahl von Differenzierungs- und Wachstumsvorgängen sowie die Immunabwehr (Horn et al. 2009). Bis zum heutigen Tage liegt keine einheitliche Nomenklatur dieser Botenstoffe vor. Verallgemeinert ist die Hauptaufgabe der Interleukine die Kommunikation zwischen Leukozyten. Chemokine sind besonders für die Rekrutierung von Entzündungszellen verantwortlich (Horn et al. 2009).

Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gehören zu den wichtigsten Zytokinen der frühen Immunabwehr und Entzündungsreaktion. In geringen Mengen initiieren sie eine lokale Entzündungsreaktion und fördern die Rekrutierung von Immunzellen in das Gewebe. In höheren Konzentrationen lösen die Zytokine systemische Reaktionen wie Fieber, eine gesteigerte Synthese von Akute-Phase-Proteinen und die verstärkte Mobilisierung von Immunzellen aus dem Knochenmark aus (Horn et al. 2009).

### **1.6.1 IL-6**

Der Großteil von IL-6 wird von mononukleären Phagozyten gebildet. Die Hauptreize zur Sekretion sind IL-1 und TNF- $\alpha$  (Horn et al. 2009). Neben der Steuerung wichtiger physiologischer Prozesse ist IL-6 ein entscheidender Faktor für den Übergang der angeborenen in die erworbene Immunabwehr (Scheller et al. 2011). Eine dauerhafte Erhöhung von IL-6 kann im Zusammenhang mit Pathologien wie der chronischen Inflammation sowie Autoimmunerkrankungen stehen (Heinrich et al. 2003). Im Auge sind erhöhte Spiegel von IL-6 in Okularflüssigkeiten bei Uveitis, Keratoconjunctivitis sicca, Glaukom, retinalen Venenverschluss, diabetischen Makularödem, proliferativen Vitreopathien und allergischen Augenerkrankungen aufgefallen (Karkhur et al. 2019). Auf Neurone kann IL-6 laut Literatur je nach Modell sowohl neuroprotektiv als auch neurodegenerativ wirken (Echevarria et al. 2017). Dies soll vom Signalweg abhängen (Rothaug et al. 2016). Der sogenannte klassische Signalweg soll regenerativ auf neuronales Gewebe, ein alternativer Signalweg über *trans-signaling* dahingegen degenerativ wirken (Rothaug et al. 2016). Bezogen auf das Auge soll IL-6 beispielsweise neuronale Zellen wie die Ganglienzellen vor einem Druck-induzierten Absterben schützen (Sappington et al. 2006) und die Regeneration der Ganglienzellen fördern (Leibinger et al. 2013). Im Gegensatz dazu vermuten Echevarria et al., dass IL-6 zur Degeneration von Axonen führen kann und eng vergesellschaftet ist mit dem Auftreten von Sehverlusten (Echevarria et al. 2017).

## **1.6.2 IL-8**

Das proinflammatorische Interleukin 8 (IL-8) gehört zu der Gruppe der Chemokine. Es wird hauptsächlich von Leukozyten und Gewebezellen gebildet. Zu den wichtigsten Sekretionsreizen zählen IL-1 und TNF- $\alpha$  (Horn et al. 2009).

Als Chemokin gehört die Rekrutierung von Immunzellen und die zelluläre Aktivierung zu den Hauptaufgaben des Zytokins (Semple et al. 2010). Auch auf Mikroglia wirkt IL-8 stark chemotaktisch und führt zu einer Reorganisation des Zytoskeletts (Cross und Woodroffe 1999). IL-8 wird eine entscheidende Rolle im Pathomechanismus inflammatorischer Erkrankungen wie Asthma, der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD), Psoriasis und Alzheimer zugeschrieben (Ha et al. 2017). Im Auge sind erhöhte Spiegel des Zytokins im Kammerwasser von Patienten mit Netzhautablösungen, mit proliferativen Retinopathien und mit Glaukom festgestellt wurden (Wang et al. 2018). Auf neuronales Gewebe soll IL-8 neurotoxisch wirken können (Thirumangalakudi et al. 2007).

## **1.6.3 IL-1 $\beta$**

Mononukleare Phagozyten wie die retinalen Mikroglia können große Mengen von IL-1 $\beta$  produzieren (Silverman und Wong 2018). Ein besonders starker Reiz zur Sekretion sind die Lipopolysaccharide aus der Zellwand gramnegativer Bakterien (Horn et al. 2009).

Neben wichtigen homöostatische Aufgaben im gesunden Organismus, ist IL-1 $\beta$  an der Steuerung von Immun- und Entzündungsreaktionen beteiligt (Ren und Torres 2009). Eine Überproduktion des Zytokins spielt eine entscheidende Rolle im Pathomechanismus unterschiedlicher Autoimmunerkrankungen (Ren und Torres 2009). Im Rahmen von okularen Erkrankungen soll IL-1 $\beta$  an den Pathomechanismen der Uveitis, der proliferativen diabetischen Retinopathie, dem diabetischen Makularödem, dem Glaukom und der altersbedingten Makuladegeneration beteiligt sein (Da Cunha et al. 2018; Wooff et al. 2019). Da Cunha et al. wiesen IL-1 $\beta$  sogar die größte Pathogenität der proinflammatorischen Zytokine im Auge zu. Bereits kleine Erhöhungen der IL-1 $\beta$ -Konzentration könnten zu einer okulären Inflammation führen (Da Cunha et al. 2018). Das Zytokin soll eine Verringerung der Retinadicke und eine Entzündung des Sehnervenkopfs verursachen (Da Cunha et al. 2018). Auf Neurone kann IL-1 $\beta$  neuroinflammatorisch, neurodegenerativ und neurotoxisch wirken (Ye et al. 2013; Wooff et al. 2019; Natoli et al. 2017; Rossi et al. 2014a).

#### **1.6.4 TNF- $\alpha$**

Der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) wird zu einem großen Anteil von mononukleären Phagozyten produziert. Ein wichtiger Sekretionsreiz sind Lipopolysaccharide (Horn et al. 2009). Zusätzlich zu den Aufgaben in der Regulation des Immunsystems beeinflusst das Zytokin wichtige Prozesse wie die Proliferation und die Differenzierung (Horn et al. 2009; Zelová und Hošek 2013). Unter bestimmten Umständen kann TNF- $\alpha$  über eine Aktivierung der Caspasen die Apoptose bestimmter Zielzelle einleiten (Horn et al. 2009). Im Auge gilt das Zytokin als Serummarker für die diabetische Retinopathie (Da Cunha et al. 2018). In experimentellen Studien bewirkte die Injektion von TNF- $\alpha$  eine Erhöhung der Proteine im Kammerwasser, Neovaskularisationen der Kornea und eine posteriore Synechie (Da Cunha et al. 2018). Auf neuronales Gewebe kann TNF- $\alpha$  neurotoxisch wirken (Ye et al. 2013; Kitaoka et al. 2006).

#### **1.7 Fragestellung der Arbeit**

Während der Behandlung mit einer Silikonöltamponade kommt es bei bis zu 30% der Patienten zu einem irreversiblen Sehverlust mit einer assoziierten Verringerung der Dicke der inneren Retinaschichten. Die Verringerung der Retinadicke könnte durch ein Absterben neuronaler Zellen bedingt sein. Welche Bedeutung die retinalen Mikroglia als Fress- und Immunzellen der Retina in der Pathogenese dieser unerklärten Sehverluste haben, ist bisher noch unerforscht. Eine denkbare Hypothese ist die Entstehung einer inflammatorischen Reaktion mit einer Mikroglia-vermittelten Neurotoxizität durch den Kontakt zum Silikonöl. Um diese Hypothese zu untersuchen, soll in dieser die Arbeit eine potentielle Interaktion zwischen emulgierten Silikonöl und retinalen Mikroglia getestet werden. Im ersten Versuchsabschnitt soll die Frage nach einer Aufnahme des emulgierten Silikonöls durch die Mikroglia und der Einfluss des emulgierten Silikonöls auf die Vitalität, die Größenverteilung und die Sekretion inflammatorischer Zytokine der Mikroglia beantwortet werden. Im zweiten Versuchsabschnitt soll eine mögliche silikoninduzierte Mikroglia-vermittelte Neurotoxizität untersucht werden. Da ein Sehverlust eine schwerwiegende Komplikation mit einer Beeinträchtigung der Lebensqualität darstellt, ist es wichtig sich mit diesen Fragestellungen zu beschäftigen und Grundlagenforschung zu betreiben. Gegebenenfalls können anhand der Ergebnisse Rückschlüsse auf die Rolle der retinalen Mikroglia im Pathomechanismus der Sehverluste gezogen werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Materialliste**

#### **2.1.1 Chemikalien und Reagenzien**

Aqua bidestillata	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Betaisodona	Mundipharma GmbH, Limburg, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution	BIO-RAD, München, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue R-250 Destaining Solution	BIO-RAD, München, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)	Hyclone, Utah, USA
Dulbecco's MEM Phenolrot	Biochrom, Berlin, Deutschland
Ethyldiamintetraacetat (EDTA)	SIGMA, Steinheim, Deutschland
Fetales Kälberserum für PC12-Zellen	Biochrom, Berlin, Deutschland
Fetales Kälberserum für Mikroglia	Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
Glutardialdehydlösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl) - ethansulfonsäure (HEPES)	C. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kollagen	Biochrom, Berlin, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5- diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Penicillin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Pferdeserum	Biochrom, Berlin, Deutschland

Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Trypan Blue Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Water-soluable tetrazolium-1 (WST-1) Reagent	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Zambonie-Fixierlösung	Morphisto, Frankfurt, Deutschland

### 2.1.2 Enzyme

DNase (Desoxyribonuklease) I	Roche applied science, Mannheim, Deutschland
DNase (Desoxyribonuklease) I	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Trypsin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

### 2.1.3 Zellkulturmedien

Mikroglia-Medium	Dulbecco´s MEM  10% fetales Kälberserum  1% Penicillin/Streptomycin
PC12-Vollmedium	RPMI 1640  10% Pferdeserum  5% fetales Kälberserum  1% Penicillin/Streptomycin
PC12-Medium (reduziert)	RPMI 1640  0,5% fetales Kälberserum  1% Penicillin/Streptomycin
PC12-Differenzierungsmedium	RPMI 1640  0,5% fetales Kälberserum  1% Penicillin/Streptomycin  NGF 2,5 S 50 ng/ml

## 2.1.4 Lösungen

Dissoziationslösung für Mikroglia	DMEM 0,24% HEPES 0,1% Trypsin 0,02% EDTA
10x PBS-Stammlösung für Zellpassagen der PC12-Zellen	NaCl 1,37 M KCl 0,03 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,07 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,02 M
Passage-EDTA für PC12-Zellen	1 x PBS-Stammlösung für Zellpassagen EDTA 0,5 mM Aqua bidestillata

## 2.1.5 Antikörper

Alexa Fluor 555 (donkey-anti goat)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Anti-Iba-1 Antikörper (goat)	Abcam ab 5076, Cambridge, Großbritannien

## 2.1.6 Eingesetzte Materialien zur Stimulation oder Differenzierung

Neuronal Growth Factor (NGF)	Alomone labs, Jerusalem, Israel
Oxane 5700 (Silikonöl= SÖ)	Bausch&Lomb GmbH, Berlin, Deutschland
Polyinosinic: polycytidylic acid (Poly I:C)	Tocris, Bristol, Großbritannien

## 2.1.7 ELISA Kits

Porcine IL-6 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA
Porcine CXCL8/IL-8 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA
Porcine IL-1B/IL-1F2 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA
Porcine TNF-alpha Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA

## 2.1.8 Sonstige Substanzen

Antibody-Diluent-Reagent	Dako, Hamburg, Deutschland Mundipharma GmbH, Limburg, Deutschland
Faramount Aqueous Mounting Medium	Dako, Hamburg, Deutschland
Fluoromount-G	Bioscience, Frankfurt, Deutschland
Hoechst	Amersham, Freiburg, Deutschland

## 2.1.9 Verbrauchsmaterialien

Einmalkanüle Sterican 100	Braun Medical AG, Emmenbrücke, Schweiz
Einmalpasteurpipetten	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einmalskalpell No.10	Feather Safety Razor CO., Osaka, Japan
Eppendorfgefäße, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mikrotestplatten, 96-Well	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Objektträger	Karl Hecht GmbH, Sondheim, Deutschland
Pipettenspitzen, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Th. Geyer GmbH, Berlin, Deutschland
Spritzenfilter, sterile nylone membrane, 0,2 µm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritze, steril, 20 ml	BD Discardit, Heidelberg, Deutschland
Tissue culture Coverslips, 18 mm, Glas	G. Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Tissue culture Coverslips, 13 mm, Plastik	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen, 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschalen	Thermo Scientific, Roskilde, Dänemark
Zellkulturschalen, 10 cm	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Zellkulturtestplatten, 12-Well	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturtestplatte, 24-Well	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugationsgefäße, 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

## 2.1.10 Geräte

Abzug Systemlabor	Köttermann GmbH, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Autoklav Varioklav	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Brutschrank 3336	Labotect, Göttingen, Deutschland
Brutschrank BB15 CO2-Inkubator	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Brutschrank Hera Cell	Heraeus, Osterode, Deutschland
Camera AxioCam MRc5	Carl Zeiss AG, Henningsdorf, Deutschland
Camera ICc5	Carl Zeiss AG, Henningsdorf, Deutschland
Einkanalpipette 10 µl,100 µl,1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eismaschine AF80	Scotsman, Milan, Italien
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Kühlschrank Premium (4°C)	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Kühlschrank Premium (-20°C)	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Kühlschrank Ultra low temperature (-80°C)	Sanyo, Moriguchi, Japan
Mehrkanal-Pipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Axioskop	Carl Zeiss AG, Henningsdorf, Deutschland
Mikroskop Axiovert 100	Carl Zeiss AG, Henningsdorf, Deutschland
Mikroskop Imager.M2	Carl Zeiss AG, Henningsdorf, Deutschland
Mikrotiterplatten-Photometer ELx800	Bioteck GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland
Präoperationsbesteck	Bausch&Lomb GmbH, Berlin, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Rasierklinge	Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
Saugpumpe Vacusafe comfort	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Saugpumpe Vacusip	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Schüttler	Infors HAT, Bottmingen, Deutschland
Sterilbank BSK	Antair, New York, USA
Sterilbank Safe 2020	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Tecan infinite M200 Reader	Tecan, Crailsheim, Deutschland

Ultraschallgerät Ultrasonic Cleaner USC-TH	VWR, Darmstadt, Deutschland
VW	
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Waschanlage ELx50	BioTek, GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland
Wasserbad 1086	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zählkammer	Neubauer, Marienfeld, Deutschland
Zentrifuge Sorvall ST40	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge 5414	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Heralus Fresco 17	Thermo Electron, Erlangen, Deutschland

## 2.1.11 Software Programme, Layout

Microsoft Windows 10	Microsoft, Washington, USA
Microsoft Excel	Microsoft, Washington, USA
Microsoft PowerPoint	Microsoft, Washington, USA
AxioVision 4.8	Carl Zeiss AG, Henningsdorf, Deutschland
Programm Gen 5	BioTek Instruments, Vermont, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1. Präparation, Kultivierung, Ernte und Nachweis retinaler Mikroglia

In diesem wissenschaftlichen Projekt dienten porcine retinale Mikroglia als vereinfachtes *in-vitro*-Modell für die Erforschung der komplexen Rolle der humanen retinalen Mikrogliazellen im menschlichen Auge. Die gesamten retinalen Mikroglia der durchgeföhrten Experimente stammten aus eigener Präparation und primärer Kultivierung. Die Präparation, Kultivierung, Ernte und Auszählung erfolgte nach dem bereits etablierten und veröffentlichten Verfahren nach Klettner et al. (Klettner et al. 2014).

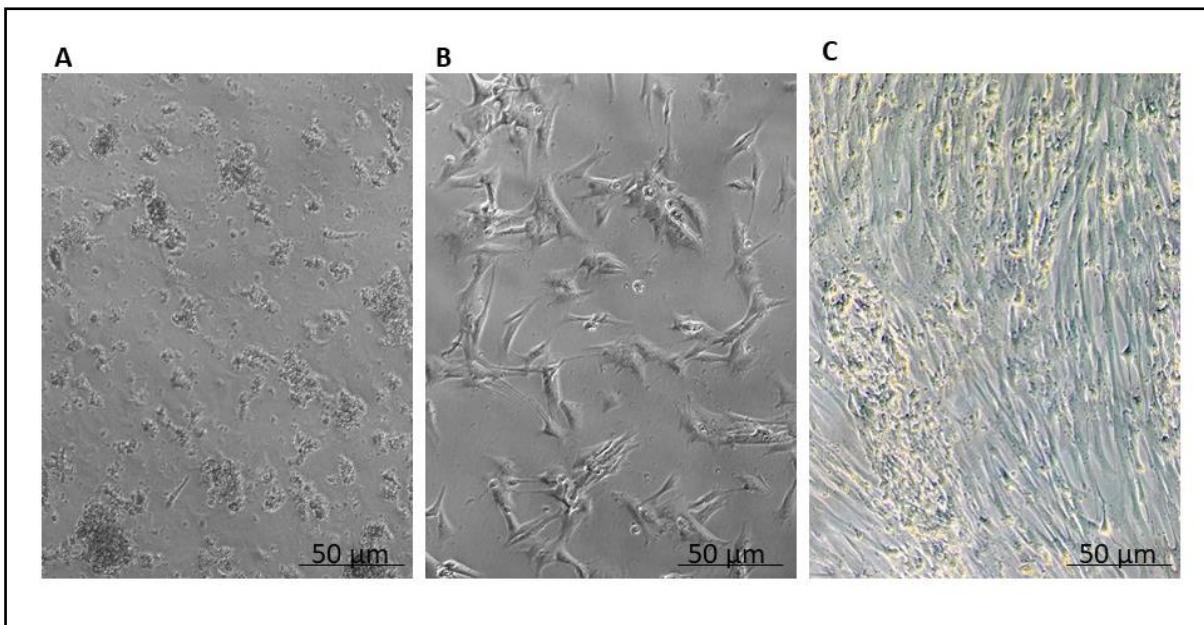
Die benötigten Schweineaugen wurden mehrmals wöchentlich von umliegenden Schlachtereien zur Verfügung gestellt. Die entnommenen Augen wurden fortlaufend gekühlt und innerhalb von maximal 4 Stunden in das Labor der Augenklink zur weiteren Verarbeitung geliefert. Nach einer ersten groben Reinigung von überflüssigem Gewebe wurden die Augen zur oberflächlichen Sterilisierung 5 Minuten in einer 33% Betaisodona-Lösung gelagert.

Anschließend wurden die noch nicht eröffneten Augen an einen sterilen Arbeitsplatz unter eine Sterilwerkbank überführt. Mithilfe einer Rasierklinge erfolgte die Eröffnung der Augäpfel hinter dem Limbus parallel zur Linse und der Glaskörper konnte entfernt werden. Die Retina wurde behutsam vom retinalen Pigmentepithel gelöst und mit einer Schere an der Papille von dem Sehnerv abgetrennt. Die so gewonnenen Retinae wurden gekühlt in einem Zentrifugenrörchen mit 15 ml phosphatgepufferter Salzlösung (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) gesammelt und weiterverwendet. Der restliche Teil des Auges wurde für die Gewinnung der Mikroglia nicht mehr benötigt. Je nach Größe der Retinae wurden 12-14 Stück gleichmäßig auf eine mit PBS vorgefüllte Well-Schale verteilt, mit einem Einweg-Skalpell auf 1-2 mm Größe zerteilt und in insgesamt acht einzelne 10 ml Röhrchen pipettiert. Nach dem Absenken der Retinae konnte der Überstand mit dem Sauger entfernt und pro Röhrchen durch 3 ml einer im Vorfeld frisch angesetzten Dissoziationslösung und 35 µl Desoxyribonuklease (DNase) ersetzt werden. Es folgte eine grobe mechanische Dissoziation durch Aufschütteln und eine 30-minütige Inkubation bei 37° Celsius bei 5,0% Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) Begasung. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurde der Überstand entfernt und weitere 50 µl DNase sowie 2 ml des serumhaltigen Zellkulturmediums pro Röhrchen hinzugefügt. Durch vorsichtige mechanische Dissoziation der Lösung mit einer 1000er-Pipette fand eine Resuspendierung und gleichzeitig eine Minimierung verbleibender retinaler Gewebsreste statt. Die gesamte Lösung aus den einzelnen Röhrchen wurde in einem 50 ml Zentrifugenrörchen gesammelt und auf vorgefüllte T-75 Filterzellflaschen von Sarstedt verteilt. Die Kultivierung erfolgte bei Inkubation bei 37° Celsius bei 5,0% CO<sub>2</sub> Begasung. Am 2., 3., 7., und 11. Tag nach Präparation wurde das Medium gewechselt. Anschließend erfolgte zweimal wöchentlich ein Mediumwechsel. Je nach der Dichte des Zellrasens wurden 10-15 ml des Mikroglia-Mediums aus Dulbecco's MEM (DMEM) mit 10% fetalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin verwendet.

### **2.2.1.2 Ernte und Bestimmung der Zellzahl der retinalen Mikroglia**

Wachstum und Zustand der Zellen hinsichtlich der Dichte der *Feedlayer*-bildenden Astrozyten und der Anzahl der Mikroglia wurden regelmäßig unter dem Lichtmikroskop kontrolliert (Abb.1). Durchschnittlich am 14. Tag nach der Präparation konnten bei ausreichendem Zellwachstum die Zellen für die Experimente gewonnen werden (Abb.1.C). Unter vorsichtigen horizontalen Schwenken der Filterzellflaschen wurden die benötigten Mikroglia von der Astrozytenzellschicht gelöst. Dieser Überstand wurde in 50 ml Zentrifugenrörchen gesammelt und bei 1200 g für 5 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation konnte der Überstand abgesaugt

werden, das zurückbleibende Pellet wurde mit frischem Medium resuspendiert (Klettner et al. 2014). Die Auszählung der Anzahl der lebenden Zellen fand über ein Trypanblau-Assay unter Verwendung einer Neubauer-Zählerkammer statt (Riss et al. 2004). Zwanzig  $\mu$ l der Zell-Suspension wurden mit je 20  $\mu$ l Trypanblau versetzt und unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Zellen konnten regelmäßig bis zur vierten Woche geerntet werden.



**Abbildung 1:** Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellkulturen bei 20x Vergrößerung am A) 3., B) 7. Und C) 14. Tag nach Präparation. A) Viel Detritus mit vereinzelten abgesetzten lebenden Zellen sichtbar. B) Wachstum der Feedlayer-bildenden Astrozyten mit vereinzelten Mikroglia sichtbar. C) Astrozytenrasen vollständig ausgebildet und mit Mikroglia behaftet.

### 2.2.1.3 Grundlegender Versuchsaufbau

Für die Experimente an den retinalen Mikroglia wurden je 250.000 Zellen/Well in 24-Well oder 96-Well-Platten ausgesetzt. Falls im Verlauf eine Färbung der Mikroglia geplant war, wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät. 24 Stunden nach der Aussaat konnte ein erster Wechsel des Mediums durchgeführt und die Mikroglia mit verschiedenen Überständen in Kontakt gebracht werden. Als Positiv-Kontrolle zur Aktivierung der Zellen wurde Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (*Polyinosinic:polycytidylic acid*, Poly I: C) im Medium (100  $\mu$ g/ml) eingesetzt (Town et al. 2006), zur Testung potentieller Auswirkungen des Silikonöls auf die Zellen wurde es im Medium emulgiert (siehe Abschnitt 2.2.4) und auf die Zellen für 24-72 Stunden aufgetragen. Je nach Experiment wurden die Mikroglia nach Färbung des ionisierten Calcium-bindenden Adapterprotein 1 (Iba-1) (siehe Abschnitt 2.2.1.4) oder Coomassie-Färbung (siehe Abschnitt 2.2.5) mikroskopisch ausgewertet, ein 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -

2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assay (siehe Abschnitt 2.2.8) durchgeführt oder die Überstände gewonnen und weiterverwendet. Die Überstände wurden für die Durchführung von enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (*Enzyme-linked Immunosorbent*, ELISA) (siehe Abschnitt 2.2.10) verwendet. Außerdem wurden die Überstände zur Stimulation von neuronal differenzierten PC12-Zellen verwendet (siehe Abschnitt 2.2.9).

#### **2.2.1.4 Immunzytochemie Iba-1**

Das Prinzip der Iba-1-Färbung als Nachweis von Mikrogliazellen beruht auf die Darstellung des sogenannten *ionized calcium-binding adapter molecule 1* (Iba-1) und wird aufgrund seiner Spezifität für Mikroglia und Makrophagen (Stankov et al. 2015) als ein wichtiger Marker für monozytäre Zellen eingesetzt (Graeber und Streit 2010; Ohsawa et al. 2004). So konnten Mikroglia identifiziert und die Reinheit der Kulturen beurteilt werden. Die Durchführung der Färbung beruhte auf bereits publizierten Protokollen (Klettner et al. 2014; Graeber und Streit 2010).

Bei dieser Technik handelt es sich um eine indirekte Immunofluoresenz. Das Grundprinzip dieser Färbung beruht auf der Bindung des 1. Antikörpers (Anti-Iba-1) an das spezifische Target (Iba-1). Im Falle einer Expression des Targetgens (Iba-1) mit entsprechender Bindung des 1. Antikörpers (Anti-Iba-1), kann ein fluoreszierender 2. Antikörper spezifisch am 1. Antikörper binden (Ohsawa et al. 2004). Die erfolgte Bindung beider Antikörper kann durch ein Fluoreszenz-Signal visualisiert und messbar gemacht werden (Ohsawa et al. 2004). Bei fehlender Expression des Targetgens (Iba-1) kann weder der 1. Antikörper noch der 2. fluoreszierender Antikörper eine Bindung eingehen. Folglich ist kein Fluoreszenzsignal messbar (Donaldson 2015). Die Auswertung der Experimente erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Imager.M2 der Firma Carl Zeiss AG. Es wurden pro Versuch 8 zufällig ausgewählte Aufnahmen ausgewählt. Die Bilder der Kontrollen und der Iba-1-Färbung wurden mit einer identischen Belichtungszeit aufgenommen um eine unspezifische Bindung des 2. Antikörpers auszuschließen. Über den Quotienten aus der Anzahl von gefärbten Zellkernen und der Anzahl von Iba-1-postiv gefärbten Zellen konnte der Mikrogliaanteil bestimmt werden.

Für die Vorbereitung dieser Färbung wurden die Zellen auf Deckgläschen aus Glas in einer 12-Well-Platte oder auf Deckgläschen aus Plastik in einer 24-Well-Platte ausgesetzt. Nach gründlicher Spülung mit PBS wurden die Zellen mit 1 ml/Well in der 12-Well bzw. 0,5 ml/Well in der 24-Well-Platte mit Zambonie-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Diesem Schritt folgte dreimaliges Spülen mit PBS. Zur weiteren Fixierung wurde 1 ml Methanol pro Well auf der 12-Well-Platte bzw. 0,5ml/Well auf der 24-Well-Platte für 10 min aufgetragen. Es

folgte erneut eine gründliche Spülung mit PBS. Nach Entfernen des Überstandes konnte der 1. Antikörper Iba-1-goat im Verhältnis 1:500 im Antibody Diluent Reagent gelöst auf die Proben aufgetragen werden (100 µl/Well bei 12-Well- und 50 µl/Well bei 24-Well-Platte). Die Negativ-Kontrolle wurde nur mit dem Antibody Diluent Reagent behandelt. Zur Bindung des Antikörpers ruhten die Proben für 60 min in einer feuchten Kammer. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der 1. Antikörper mit PBS von den Zellen gewaschen. Folgend konnte nun der 2. Antikörper (donkey-anti-goat 555) im Verhältnis 1:700 im Antibody Diluent Reagent gelöst auf die vorbereiteten Zellen aufgetragen werden (100 µl bei 12-Well- und 50 µl bei 24-Well-Platte). Die Färbung der Zellkerne der Mikroglia erfolgte mit Hoechst 1:500. Für weitere 60 min ruhten die Proben in der feuchten Kammer. Abschließend wurden die Deckgläschen mehrmals mit PBS und einmalig mit 1 ml Aqua destillata gespült. Das Eindecken der Deckgläschen auf die Objektträger erfolgte mit Fluoromount.

## **2.2.2 Herkunft, Kultivierung und Differenzierung der PC12-Zellen**

### **2.2.2.1 Herkunft und Kultivierung der PC12-Zellen**

Mit freundlicher Unterstützung insbesondere von Frau PD Dr. Vicki Wätzig wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie des UKSH Campus Kiel eine mögliche Neurotoxizität von Mikroglia-Überständen nach Inkubation mit Silikonöl auf neuronale Zellen getestet. Sämtliche unter 2.2.2 aufgeführte Punkte wurden im Labor des Instituts für Experimentellen und Klinischen Pharmakologie anhand dort vorliegender Protokolle durchgeführt (Waetzig und Herdegen 2005; Waetzig et al. 2008; Loose und Herdegen 2012).

Die PC12-Zellen gehören zu einer neoplastischen Ziellinie aus dem Nebennierenmarkstumor (Phäochromozytom) der Ratte (Liaqat et al. 2017). Im undifferenzierten Zustand ähneln die PC12-Zellen stark den adrenergen chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks (Liaqat et al. 2017). Die PC12-Zellen zeichnen sich durch die besondere Fähigkeit zur neuronalen Differenzierung aus (Greene und Tischler 1976). Aufgrund dieser Fähigkeit kann die PC12-Zelllinie seit Jahren erfolgreich als Modellsystem für die Erforschung der neuronalen Morphologie und Differenzierung, der Neuroprotektion und der Neurotoxizität genutzt werden (Tischler 2002; Liaqat et al. 2017; Los Rios et al. 2018). Die Differenzierung kann durch die Inkubation der Zellen mit *Neuronal Growth Factor* (NGF) erreicht werden (Greene 1978; Greene und Tischler 1976). Während der Inkubation mit NGF finden zahlreiche funktionelle und morphologische Veränderungen der Zelle statt. Die potentiell mitotisch-aktiven PC12-

Zellen verharren in einem postmitotischen Zustand (Greene und Tischler 1976). Sie gehen in einen elektrisch-erregbaren Zustand über (Radio und Mundy 2008). Die Expression neuronaler Proteine wie der katecholaminergen Neurotransmitter, der Acetylcholinrezeptoren und der Acetylcholinesterase wird gesteigert (Radio und Mundy 2008). Auch ihr Erscheinungsbild verändert sich. Es werden lange, verzweigte Neuriten ausgebildet (Greene 1978; Seow et al. 2017; Greene und Tischler 1976). Diese Neuriten entstehen nach ca. 24-48 Stunden Inkubation mit NGF (Radio und Mundy 2008). Die Vorgänge der Differenzierung sind reversibel. Nach Entzug des NGF verlieren die Zellen innerhalb kürzester Zeit die gebildeten Zellausläufer und werden erneut mitotisch aktiv (Greene und Tischler 1976). Trotz der beschriebenen funktionellen und morphologischen Ähnlichkeit handelt es sich bei den differenzierten PC12-Zellen nicht um „echte“ Neuronen. Axone oder Dendriten mit funktionsfähigen Synapsen werden nicht ausgebildet (Radio et al. 2010; Das et al. 2004; Radio und Mundy 2008). Die verwendeten Zellen stammen vom German Collection of Microorganisms und Cell Cultures (DSMZ) in Braunschweig. Die Kultivierung der PC12-Zellen fand bei 37° Celsius und 5,0 CO<sub>2</sub> Begasung auf kollagenbeschichteten Kulturschalen statt.

### **2.2.2.2 Kollagenbeschichtung der Kulturschalen**

Für die erfolgreiche Kultivierung und die Differenzierung der PC12-Zellen ist die Beschichtung der Schalen mit Kollagen essentiell. Für naive Zellen wurde eine Lösung im Verhältnis 1:5 von PBS zu Kollagen, für differenzierte Zellen im Verhältnis 1:10 PBS zu Kollagen verwendet. Je 1 ml der entsprechenden Lösung wurde pro Kulturschale aufgetragen und verteilt, die überflüssige Lösung konnte anschließend mit einer Pipette entfernt werden. Zur Bindung des Kollagens ruhten die Schalen für insgesamt 60 min bei 37° Celsius im Inkubator. Nach Ablauf der Inkubationszeit konnte das ungebundene Kollagen mit PBS abgewaschen werden und die so beschichteten Kulturschalen unter der Sterilwerkbank trocknen (Loose und Herdegen 2012).

### **2.2.2.3 Vermehrung der PC12-Zellen**

Die Vermehrung der PC12-Zellen wurde auf den beschichteten 10 cm Kulturschalen durchgeführt. Zu Beginn wurde das Zellmedium entfernt, die Zellen mit 2 ml Passage-Ethylendiamintetraacetat (EDTA) gewaschen und nach Zugabe weiterer 2 ml EDTA für 2 min bei 37° Celsius inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde 5 ml Vollmedium pro Schale hinzugefügt. Die adhärenten Zellen konnten mit einem Schaber vom Boden gelöst werden. Die gesammelte Lösung wurde für 10 min bei 1000 rpM zentrifugiert. Anschließend konnte der

Überstand verworfen werden und das zurückbleibende Zell-Pellet im Medium resuspendiert werden. Die Zellen wurden in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/Well in der 96-Well-Platte ausgesät. Alle 2 bis 3 Tage musste das PC12-Medium aus Roswell Park Memorial Institute-Medium (RPMI) 1640, 10 % Pferdeserum, 5 % fetalen Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin ausgewechselt werden (Loose und Herdegen 2012).

#### **2.2.2.4 Differenzierung der PC12-Zellen**

Um eine Ausdifferenzierung der PC12-Zellen in postmitotische, Neuronen-ähnliche Zellen zu erreichen, beinhaltete das Medium 1-2 Tage nach dem Aussetzen für 72 Stunden lediglich 0,5% fetales Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin. Nach Ablauf dieser Zeit fand alle 2 bis 3 Tage für insgesamt 1 Woche ein Wechsel des Mediums statt, wobei 50 ng/ml NGF 2,5 S zum Medium hinzugefügt worden sind (Loose und Herdegen 2012; Waetzig und Herdegen 2005). Durch NGF war eine Neuronen-ähnliche Differenzierung der Zellen möglich (Rudkin et al. 1989; Greene 1978; Seow et al. 2017).

#### **2.2.3 Eigenschaften des verwendeten Silikonöls**

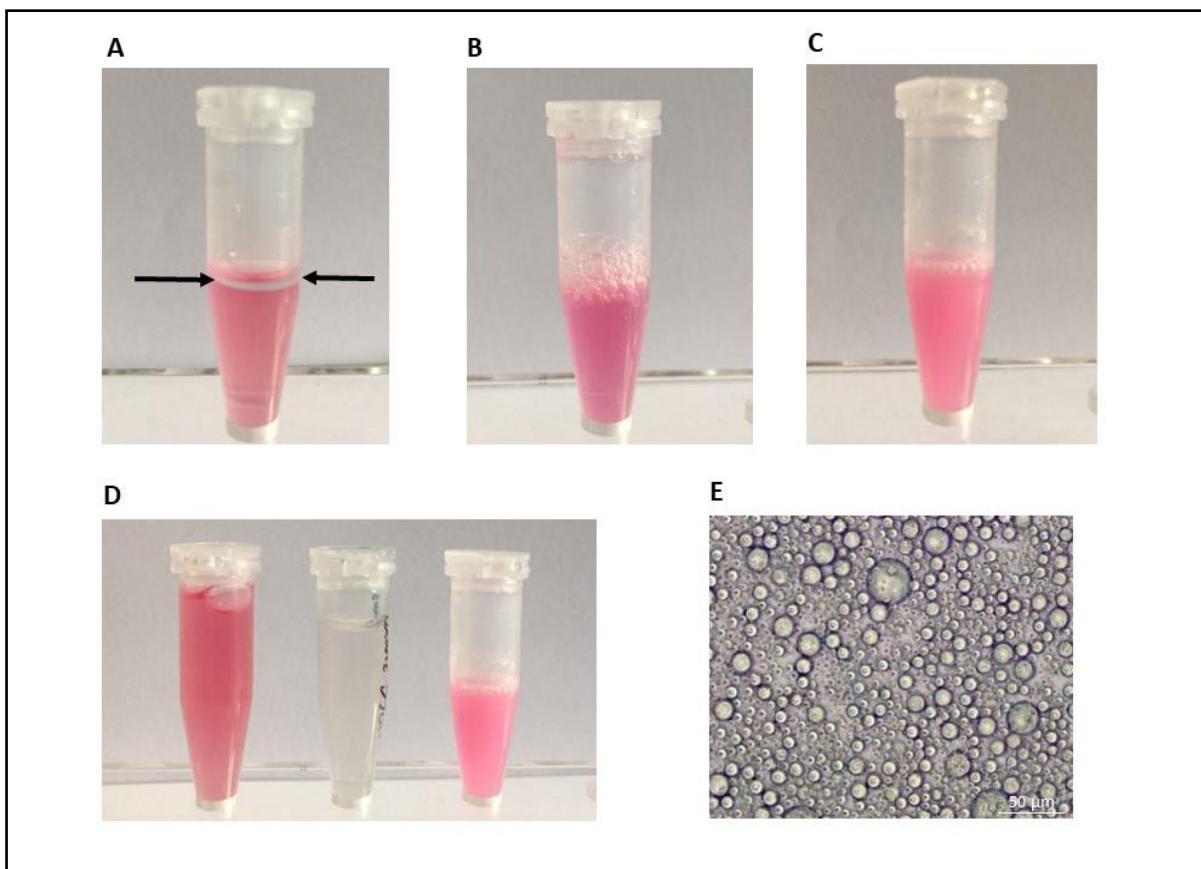
In diesem Projekt wurde aufgrund seines häufigen Einsatzes in der Augenklinik des UKSH Campus Kiel hochreine Oxane 5700 von Bausch & Lomb für die Experimente verwendet. Alle folgenden Angaben stammen von der Internetseite des Herstellers und können zur weiteren Information unter der benannten Internetseite eingesehen werden (<https://www.bausch-lomb.de/fachbereich/augen-chirurgen/vitreoretinale-tamponaden/oxaner/>).

Die Dichte der Oxane 5700 (bei 22° Celsius) beträgt 0,98 g/cm<sup>3</sup>, die Viskosität (bei 25° Celsius) 5000 mPa.s, die Grenzflächenspannung zu Wasser 44,9 mN/m und der Brechungsindex 1,40 (bei 20°Celsius). Sie werden zur Behandlung der diabetischen Retinopathie, proliferativen Vitreoretinopathie, Riesenrissen, Netzhautablösungen durch perforierendes Trauma, bei inoperablen Blutungen oder epiretinalen Membranen verwendet.

#### **2.2.4 Emulsionsbildung von Silikonöl**

Um das Silikonöl in Kontakt mit den Mikroglia zu bringen, wurde das Silikonöl im Medium (DMEM, 10% fetales Kälberserum, 1% Penicillin/Streptomycin) per Ultraschall emulgiert (1%, 5% und 10%) und auf die Zellen für 24-72 Stunden aufgetragen. Der Einsatz von Ultraschall zur Emulsionsbildung zweier Phasen ist eines von mehreren möglichen Verfahren

zur Emulgierung (Caramoy et al. 2011; Chan et al. 2017). Die entsprechenden Mengen an Medium und Silikonöl wurden in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Aufgrund der unterschiedlichen chemischen Eigenschaften war eine deutliche Trennung der beiden Substanzen zu sehen (Abb.2.A). Diese Eppendorf-Gefäße wurden wenige Minuten auf dem Reagenzglasmischer durchmischt, sodass sich mehrere grobe Silikonölblasen bildeten (Abb.2.B). Anschließend wurde für 30 min bei Temperaturen von 23° bis 37° Celsius das Silikonöl durch Ultraschall emulgiert. Nach diesem Schritt konnte man makroskopisch eine Trübung und Aufhebung der hydrophilen und hydrophoben Phase erkennen (Abb.2.C). Im Lichtmikroskop waren viele kleine Silikonöl-Blasen unterschiedlichster Größe gelöst im Mikroglia-Medium zu erkennen (Abb.2.E).



**Abbildung 2:** Exemplarische Darstellung des Herstellungsvorganges einer Silikonöl-Emulsion. A) Mikroglia-Medium mit abgegrenztem klaren Silikonöl (siehe Pfeile). B) Mikroglia-Medium mit Silikonölblasen nach der mechanischen Durchmischung mithilfe des Reagenzglasmischers. C) Makroskopisch trübe Emulsion nach 30 min Ultraschall. D) makroskopischer Vergleich der Eppendorf-Gefäße gefüllt (von links nach rechts) mit unbehandeltem Mikroglia-Medium, Silikonöl, Silikonöl-Medium-Emulsion. E) Lichtmikroskopische Darstellung der Emulsion, zu erkennen sind Silikonölblasen unterschiedlicher Größen bei 20x Vergrößerung.

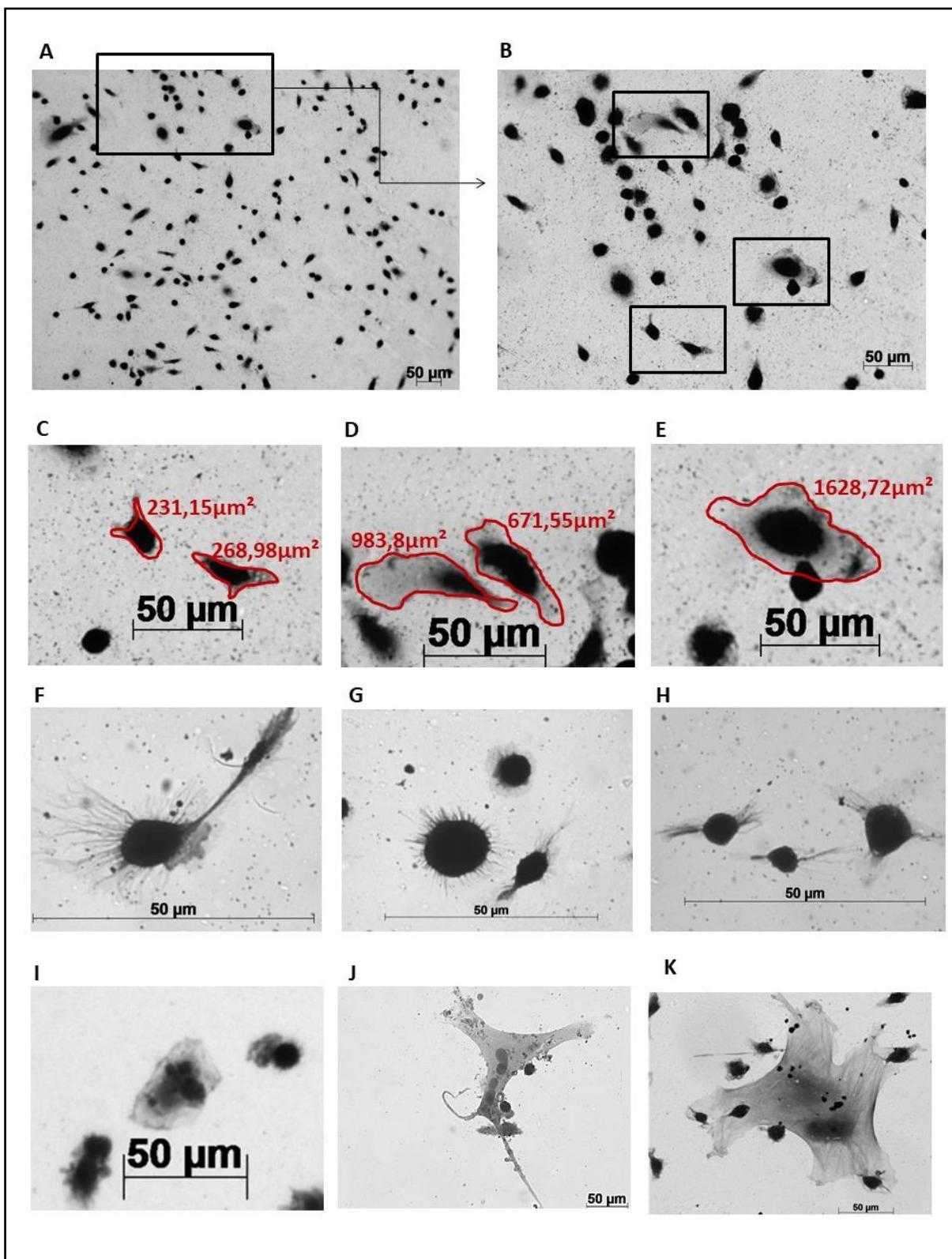
## **2.2.5 Coomassie-Färbung**

Die Auswertung der Morphologie, der Größeneinteilung und der Silikonaufnahme der Mikroglia erfolgte nach Coomassie-Färbung am Lichtmikroskop. Das Protokoll der Coomassie-Färbung des anatomischen Instituts des UKSH Campus Kiel wurde in dieser Arbeit modifiziert (Heimke 2018; Behrendt et al. 2016).

Die Mikroglia wurden auf Plastik-Deckgläschen ausgesät. Nach Ablauf der Experimente erfolgte die Entfernung des Überstandes und Spülung mit je 1 ml PBS pro Well in der 24-Well-Platte. Die Fixierung der Zellen wurde mit 0,5 ml/Well 2,5% Glutardialdehydlösung für 40 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde 3-mal mit 1 ml/Well PBS gespült und die Mikroglia für 10 min mit 0,5 ml/Well der Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution gefärbt. Die Entfärbung erfolgte mit 0,5 ml/Well der Coomassie Brilliant Blue R-250 Destaining Solution für insgesamt 40 min. Nach 20 min wurde die Destaining Solution ausgewechselt. Als letzter Schritt erfolgte nach gründlicher Spülung mit PBS und Aqua destillata die Eideckung der Deckgläschen mit Faramount.

## **2.2.6 Morphologie der Mikroglia**

Mikroglia zeichnen sich durch eine hohe morphologische Variabilität aus. Klassischerweise findet eine Unterteilung in ruhende und aktivierte Formen statt (Graeber und Streit 2010; Block und Hong 2005). Ruhende Formen (Abb.3.C/F/G/H) sind durch kleine Zellkörper mit verzweigten, zarten Ausläufern charakterisiert (Graeber und Streit 2010). Amöboide Zellen (Abb.3.D/I) wirken im Vergleich vergrößert, plumper mit stark minimiert ausgeprägter Ramifizierung (Boche et al. 2013). In dieser Arbeit wurde eine Kategorisierung der gefärbten Zellen anhand der Größenverteilung unbehandelter Mikroglia etabliert. Die gebräuchlichen Kategorien dieser Arbeit lauten: ruhende ( $100\text{-}500 \mu\text{m}^2$ ), amöboide ( $500\text{-}1000 \mu\text{m}^2$ ) und Riesenzellen ( $>1000 \mu\text{m}^2$ , Abb.3.E/J/K). Die verwendeten Größen wurden anhand lichtmikroskopischer Analyse von unbehandelten Mikroglia im Rahmen dieser Arbeit festgelegt. Zur Kontrolle der Umsetzbarkeit bzw. der Fähigkeit bei einer Aktivierung der Mikroglia anhand dieser Kriterien eine Veränderung in der morphologischen Verteilung wahrnehmen zu können, diente die Positivkontrolle. Dazu erfolgte der Vergleich der Größenverteilung der Zellen der Positivkontrolle mit Poly I:C (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zu den unbehandelten Zellen der Kontrollen nach 24 Stunden (Town et al. 2006).

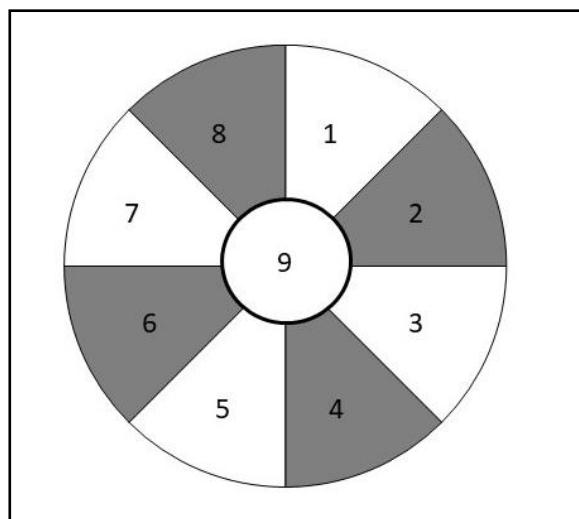


**Abbildung 3:** Größenbeispiele der Mikroglia und exemplarische Beispelfotos der 3 Gruppen nach Coomassie-Färbung A) Mikroglia bei 10 x und B) bei 20x Vergrößerung im Lichtmikroskop. C) Beispiel zweier ruhender Mikrogliazellen ( $<500 \mu\text{m}^2$ ), D) Beispiel zwei amoeboider Mikrogliazellen ( $500-1000 \mu\text{m}^2$ ) und E) Beispiel einer Riesenzelle ( $>1000 \mu\text{m}^2$ ) aus Abbildung B. Einzelne lichtmikroskopische Aufnahmen nach 24 Stunden Inkubation mit unbehandeltem Medium von F), G), H) ruhenden Mikroglia mit zahlreichen zarten Ausläufern, I) amoeboider Mikrogliazelle und J), K) Riesenzellen. Eine Auswahl der Fotos wurde 2020 in Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol veröffentlicht (Klettner et al. 2020).

## 2.2.7 Silikon-Einschlüsse der Mikroglia

Um eine mögliche Aufnahme des Silikonöls aus dem Medium durch die Mikroglia bewerten zu können, wurden Zellen nach entsprechenden Experimenten Coomassie-Blau gefärbt und bei einer Vergrößerung von 20x lichtmikroskopisch ausgewertet. Bei Unklarheiten erfolgte eine genauere Kontrolle unter Einsatz der 63x Vergrößerung. Nach einem festen Schema wurden pro Versuch 9 Fotos in bestimmten Bereichen des Deckgläschen aufgenommen (siehe Abb.4) und analysiert. Die Kriterien zur Analyse wurden anhand mikroskopischer Auswertung von Bildern unbehandelter Kontrollen vergleichend mit Bildern von Zellen nach Inkubation mit Silikonöl festgelegt. In dieser Arbeit wurden ungefärbte Einschlüsse mit klarer Abgrenzung zum umgebenden Zytoplasma und klarer intrazellulärer Lage als Silikoneinschlüsse gewertet. Die Einschlüsse können einzeln oder in Gruppierungen auftreten. Aufgrund der sehr starken Blaufärbung von kleinen, ruhenden Mikroglia wurden bei diesen Zellen auch leicht bläuliche, klar abgegrenzte und intrazellulär liegende Einschlüsse als Silikonoleinschlüsse gewertet.

Da es aufgrund verschiedenster Ursachen auch in den Kontrollen zu Aufhellungen, Granula, Vakuolen, Unregelmäßigkeiten im Zytoplasma oder Artefakten kommen kann, wurde versucht diese Silikonöl-unspezifischen Veränderungen durch die genannten Kriterien auszuschließen. Runde, helle Aussparungen im Zytoplasma, welche nicht komplett intrazellulär lagen oder in der 63x Vergrößerung mit unscharfem Übergang auffielen, wurden als nicht spezifisch für Silikonöl gewertet.



**Abbildung 4:** Fotoraster zur Auswertung der Einschlüsse. Pro Feld erfolgte die Aufnahme eines zufälligen Fotos.

## **2.2.8 MTT-Assay**

Die Vitalität der retinalen Mikroglia nach Inkubation mit silikonhaltigem Medium wurde mithilfe des MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5diphenyltetrazoliumbromid)-Assays evaluiert. Anhand dieses Assays kann über der Darstellung der metabolischen Aktivität über den Umsatz des gelblichen Terazoliumsalzes zum violetten Formazan durch vitale Zellen ein Rückschluss auf die Zellviabilität bzw. auch Toxizität eines Stoffes gezogen werden (Riss et al. 2004; Morgan 1998). Der Umsatz findet über die mitochondriale Dehydrogenase (Succinat-Dehydrogenase) und die Reduktionsäquivalente Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) und Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) statt (Mosmann 1983).

Die Kontrolle und die entsprechenden silikonhaltige Proben wurden für 24-72 Stunden inkubiert. Nach Entfernung der Überstände wurde mit 1 ml PBS/Well gewaschen und 250 µl der MTT-Gebrauchslösung konnten pro Well in der 24-Well-Platte pipettiert werden. Zur Herstellung der MTT-Gebrauchslösung wurde 1 ml MTT (5 mg/ml) 1:10 in 9 ml DMEM ohne Phenolrot gelöst. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37° Celsius und 5,0% CO<sub>2</sub> Begasung im Inkubator konnte die MTT-Lösung entfernt werden. Da die Mikroglia sich leicht vom Boden des Wells lösten, wurden die MTT-Überstände im Eppendorf-Gefäß gesammelt und wenige Minuten zentrifugiert. Das entstehende Pellet konnte mit 150 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und anschließend zurück in das ursprüngliche Well überführt werden. Die auszulesende 96-Well-Platte wurde mit 150 µl DMSO als Doppelwert für den Nullwert und mit 100 µl DMSO sowie 50 µl der entsprechenden Probe als Doppelwert vorbereitet. Es folgte eine Analyse im ELISA-Reader bei 550 nm. Das Ergebnis der Kontrolle (Medium und Mikroglia) wurde als 100%-Wert gesetzt.

## **2.2.9 WST-1-Assay**

Um eine potentielle Neurotoxizität von Mikroglia-Überständen nach Inkubation mit Silikonöl zu untersuchen, wurde ein Assay mit wasserlösliches Tetrazolium-1 (*Water Soluble Tetrazolium*, WST-Assay) an differenzierten PC12-Zellen durch das Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie durchgeführt. Das Prinzip dieses Assays besteht auf der Aufnahme des Tetrazoliumsalzes durch stoffwechselaktive vitale Zellen und anschließende Reduktion durch die Superoxiddismutase zu einem Formazan-Salz. Dieser Farbumschlag kann ausgemessen werden und gibt Auskunft über den Zellmetabolismus (Peskin und Winterbourn 2017).

In diesem Versuchsaufbau wurden die Zellen auf einer 96-Well-Platte in einer Anzahl von 2x 10<sup>6</sup>/Well ausgesät, differenziert und mit 50 µl/Well der Mikroglia-Überstände inkubiert. Nach 48 Stunden Inkubation der PC12-Zellen wurde aufgrund von Kulturbedingungen auf eine längere Experimentdauer verzichtet und das Assay durchgeführt. Pro Well wurden 10 µl der aufgewärmteten WST-1-Lösung pipettiert und die Zellen anschließend für 2 Stunden bei 37° Celsius und 5% CO<sub>2</sub> Begasung im Inkubator belassen. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte ein kurzes Schütteln und eine Auslesung der Platte bei 450 bis 600 nm Schütteln mithilfe des Tecan infinite M200 Reader (Waetzig et al. 2017; Loose und Herdegen 2012).

Die getesteten Überstände wurden durch entsprechende Experimente an retinalen Mikroglia gewonnen (siehe Abschnitt 2.2.1.3). Es wurden die Auswirkungen der Überstände der Mikroglia mit silikonhaltigem Medium (10% für 72 Stunden), Überstände von Mikroglia mit unbehandeltem Medium (72 Stunden), silikonölhaltiges Medium ohne Mikroglia und als Kontrolle unbehandeltes Medium ohne Mikroglia untersucht (siehe Abb. 2.5). Als Positivkontrolle dienten Überstände von stimulierten Mikrogliazellen (24 Stunden Poly I:C 100 µg/ml). Außerdem wurden Überstände von Mikroglia mit unbehandeltem Medium (24 Stunden) und Medium mit Poly I:C ohne Mikroglia getestet. Alle Signifikanzen wurden im Vergleich zur absoluten Kontrolle (unbehandeltes Medium ohne Mikroglia) errechnet.

## 2.2.10 ELISA

Um eine mögliche Veränderung der Sekretion inflammatorischer Zytokine durch retinale Mikroglia nach Silikonöl-Exposition zu untersuchen, wurden Mikroglia-Überstände nach 72 Stunden Inkubation mit 10% silikonölhaltigem Medium hinsichtlich der Konzentrationen von IL-6, IL-8, IL-1β und TNF-α untersucht. Die Analyse erfolgte mithilfe des ELISA-Verfahren. Es wurde mit den ELISA-Sets von R&D Systems gearbeitet unter Verwendung des porcinen IL-6, CXCL8/IL-8, IL-1B/IL-1F2 und TNF-alpha *Quantikine ELISA Kits*.

Das ELISA-Verfahren zählt zu den antikörperbasierten Nachweisverfahren für spezifische Proteine. Der erste Antikörper ist direkt am Boden der 96-Well-Platte gebunden, dieser Antikörper bindet das gesuchte bzw. nachzuweisende Protein spezifisch. Im Falle einer Bindung kommt es so zu hohen Konzentrationen des nachzuweisenden Proteins auf der Trägerfläche. Ein zweiter Antikörper mit Kopplung an eine Peroxidase bindet dasselbe Protein an einem anderen Epitop. Über die gebundene Peroxidase kann unter diesen Bedingungen ein photometrisch messbarer Farbumschlag stattfinden. Durch die Intensität der Färbung kann ein Rückschluss auf die Konzentration des gesuchten Proteins in der Probe gezogen werden. Wenn

dieses Protein jedoch nicht in der Probe vorhanden ist, erfolgt weder eine Bindung an den ersten Antikörper noch an den zweiten Antikörper. Infolgedessen findet kein Farbumschlag über die Peroxidase statt (Cox et al. 2004).

Die Durchführung des Assays wurde nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt und wird aufgrund unterschiedlicher Mengenangaben nicht für die einzelnen Kits, sondern zusammenfassend und verallgemeinert wiedergegeben. Beginnend erfolgte die Vorbereitung der Reagenzien, Proben, Kontrollen und Standards nach Angaben des Herstellers. Anschließend wurden 50 µl *Assay Diluent* pro Well auf die Platte aufgetragen. Folgend konnte der Standard, die Kontrolle oder die entsprechende Probe aufgetragen werden (je nach Kit 50 µl bis 100 µl pro Well) und für insgesamt 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem horizontalen Platten-Schüttler bei 500+- 50 rpm inkubiert werden. Nach Ablauf der Zeit konnten die Proben entfernt werden und es wurde pro Well mit 400 µl des *Wash Buffers* 5-mal gewaschen. Das IL-Konjugat wurde aufgetragen (je nach Kit 100 µl bis 200 µl pro Well) und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Es folgte eine weitere Spülung der Wells mit dem *Wash Buffer*. Nun konnte die *Substrat Solution* (je nach Kit 100 µl bis 120 µl pro Well) pipettiert werden und die Platte lichtgeschützt inkubiert werden. Unter diesen Bedingungen konnte durch die Umsetzung des Substrates durch die Peroxidase der Farbumschlag stattfinden. Nach 30 min wurde dieser Vorgang durch das Hinzufügen der *Stop Solution* (je nach Kit 100 µl bis 120 µl pro Well) beendet. Die Platte konnte nach Beendigung dieser Arbeitsschritte bei 540 bis 570 nm mithilfe des Photometer ELx800 photometrisch ausgemessen werden.

Neben den Überständen der Experimente (10% SÖ für 72 Stunden) und den dazugehörigen Kontrollen (Mikroglia und Medium für 72 Stunden) wurde auch unbehandeltes Mikroglia-Medium (ohne Inkubation mit Zellen) und silikonhaltiges Medium (ohne Inkubation mit Zellen) in der ELISA-Platte getestet um mögliche Kreuzreaktionen der Antikörper durch unspezifische Inhaltsstoffe bzw. Silikonöl auszuschließen. Die Signifikanzen wurden durch Gegenüberstellung der Ergebnisse des ELISAs der Experimente (10% SÖ für 72 Stunden) zur unbehandelten Kontrolle errechnet (Mikroglia und Medium für 72 Stunden).

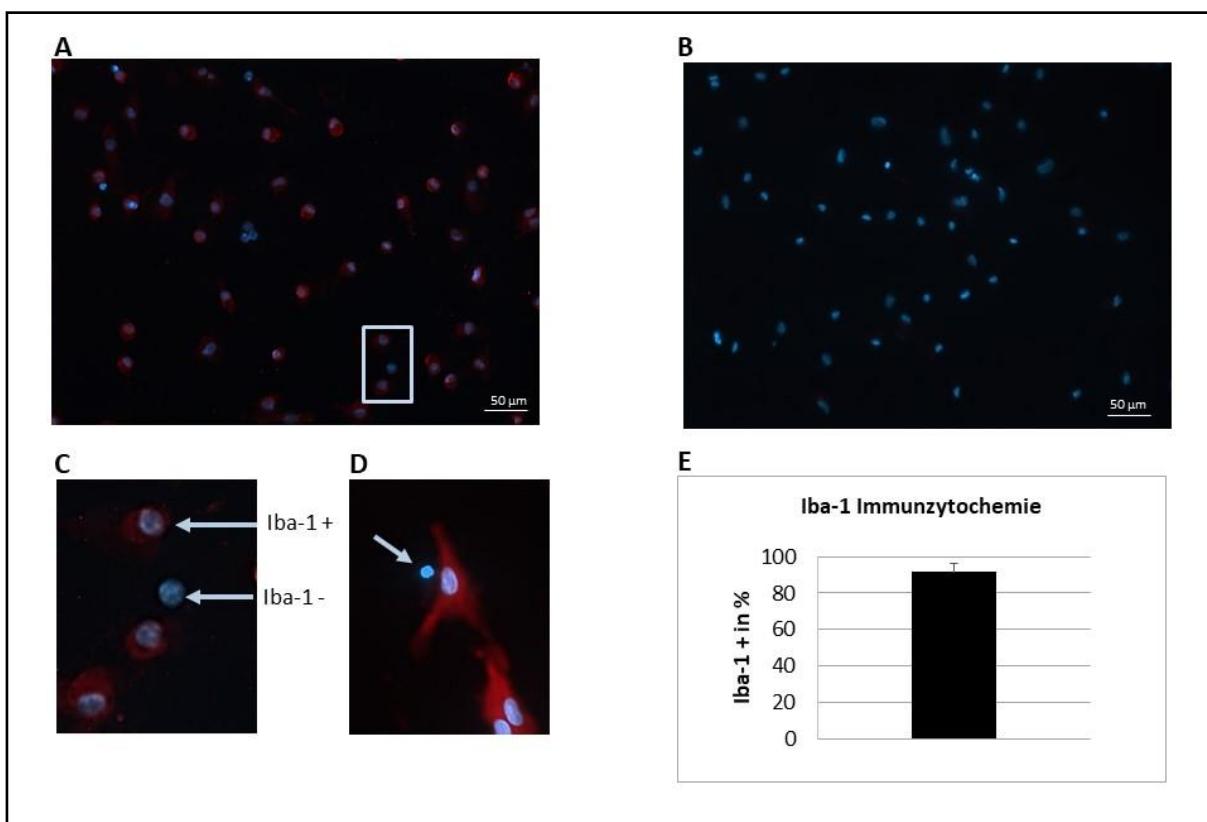
## 2.2.11 Statistik

Alle ausgewerteten Experimente wurden mindestens 3-mal durchgeführt, die Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-test mit dem Programm Excel bestimmt. Es wurde mit gebräuchlichen Signifikanzniveaus mit + für p < 0,05, ++ für p < 0,01 und +++ für p < 0,001 gearbeitet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Nachweis der Mikroglia

Mithilfe der unter 2.2.3 beschriebenen Iba-1-Färbung erfolgte die Identifizierung der geernteten Zellen. Insgesamt wurden 1.597 Zellen fotografiert und analysiert. Der Anteil von 732 Iba-1 positiven Zellen ( $n=800$ ) nach Färbung mit dem 1. und 2. Antikörper und Kernfärbung mit Hoechst (Abb.5) entsprach einem Anteil von Mikroglia an der Gesamtheit der geernteten Zellen von 91,5% (Abb.5 E). Nach Inkubation mit dem 2. Antikörper und Kernfärbung mit Hoechst (Abb.5 B) präsentierten sich in der Kontrolle 795 Zellen ( $n=797$ ) mit einem Iba-1-negativem Färbverhalten, 2 Zellen zeigten eine unspezifische positive Färbung. Demnach lag bei 0,25% der ausgewerteten Zellen der Kontrolle ein Signal vor, welches in der Belichtungszeit und in der Wellenlänge der Fluoreszenz der positiven Iba-1-Färbung entsprach.



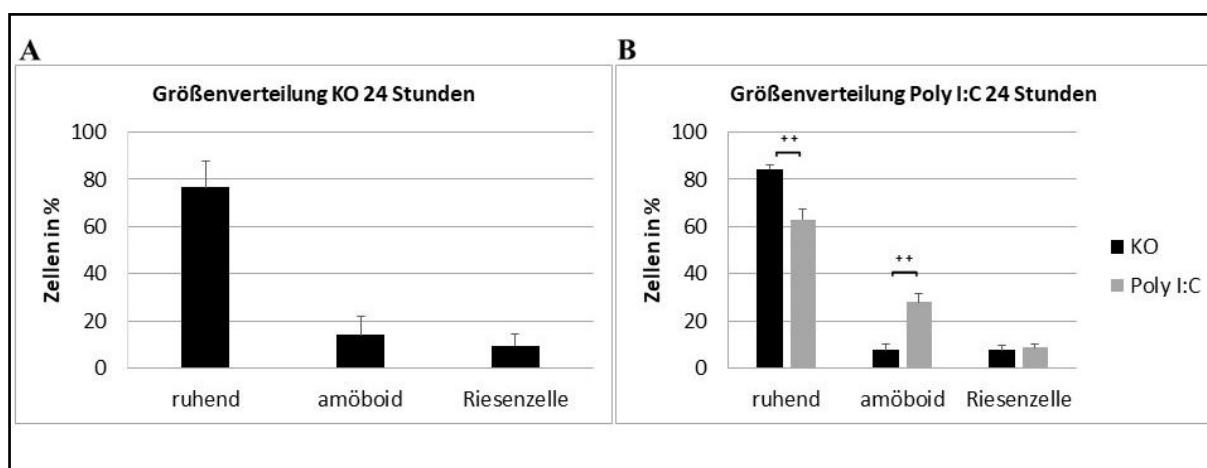
**Abbildung 5:** Ergebnisse der Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1) Färbung der retinalen Mikroglia mit fluoreszenzmikroskopischen Beispielbildern. A) Iba-1-Färbung (1. Antikörper (AK) Anti-Iba-1, 2. AK Alexa Fluor 555 und Kernfärbung mit Hoechst) und B) Negativkontrolle (2. AK Alexa Fluor 555 und Kernfärbung mit Hoechst). C) Beispiel einer Iba-1 positiven und negativen Zelle aus Bildabschnitt A (siehe Pfeile). D) Beispiel einer stark blauen Iba-1 negativen Zelle. E) Anteil der Mikroglia an der Gesamtheit der geernteten Zellen. Y-Achse als Anteil an Iba-1 positiven Zellen in %. Die Daten und eine Auswahl der Fotos wurden 2020 in Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol veröffentlicht (Klettner et al. 2020).

### 3.2 Größenverteilung der Mikroglia

#### 3.2.1 Größenverteilung der Mikroglia nach 24 Stunden

Über die Auswertung von 8 Kontrollexperimenten mit je 9 Fotos pro Deckgläschen und Ausmessung von insgesamt 3.591 Mikroglia konnte eine durchschnittliche Größenverteilung der retinalen Mikroglia nach 24 Stunden Inkubation mit unbehandeltem Medium bestimmt werden. In der Kontrolle lagen nach 24 Stunden durchschnittlich 76,52% (+/-11,31) der Mikroglia im ruhenden Zustand, 14,10% (+/-7,69) in der amöboiden Form und 9,49% (+/-5,30) als Riesenzellen vor (Abb.6.A).

Nach der Analyse von 3.087 Zellen der Positivkontrolle (100 µg/ml Poly I:C für 24 Stunden) zeigten sich signifikante Veränderungen der Größenverteilung (Abb.6.B). Der Anteil an ruhenden Zellen sank signifikant ( $p<0,01$ ) auf 63,08% (+/-4,58) im Vergleich zur Kontrolle mit 84,46% (+/-1,76). Der Anteil der amöboiden Mikroglia stieg ( $p<0,01$ ) auf 28,00% (+/-3,52) im Vergleich zur Kontrolle mit 7,77% (+/-2,46). Der Anteil an Riesenzellen bei Inkubation mit Poly I:C erschien mit einem prozentualen Anteil von 8,91% (+/-1,21) nicht signifikant verändert zum Kontrollwert von 7,77% (+/-1,98).



**Abbildung 6:** Größenverteilung der Kontrollen (KO) der retinalen Mikroglia. A) 24 Stunden Inkubation mit unbehandeltem Medium als KO und B) 24 Stunden Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C) 100 µg/ml als Positivkontrolle mit dazugehöriger KO. X-Achse zur Einteilung der Zellen nach Größe in die Gruppierung der ruhenden ( $100\text{-}500 \mu\text{m}^2$ ), amöboiden ( $500\text{-}1000 \mu\text{m}^2$ ) und Riesenzellen ( $> 1000 \mu\text{m}^2$ ), Y-Achse als Anteil der Zellen in %. In den Graphen werden die Kontrollen (KO) in schwarz und die Experimente mit Poly I:C in grau dargestellt. Die Signifikanzen wurden mithilfe des Student's t-test bestimmt mit +  $p < 0,05$ ; ++  $p < 0,01$ ; +++  $p < 0,001$ . Die Daten wurden 2020 in Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol veröffentlicht (Klettner et al. 2020).

### **3.2.2 Größenverteilung der Mikroglia nach SÖ für 24 Stunden**

Nach Ausmessung von 4.980 Mikrogliazellen nach 24 Stunden Inkubation (5% SÖ, 10% SÖ und KO) konnten keine signifikanten Veränderungen der Größenverteilung gegenüber der Kontrolle entdeckt werden (Abb.7.A). Bei 5% SÖ zeigte sich ein Anteil von 70,39% (+/-12,99) an ruhenden, 17,49% (+/-8,06) an amöboiden und 12,4 % (+/-5,67) an Riesenzellen. Bei 10% SÖ betrug der Anteil an ruhenden Zellen 65,79% (+/-14,01), an amöboiden Zellen 16,87% (+/-6,23) und an Riesenzellen 17,35% (+/-10,45). Die Größenverteilung der Mikroglia der Kontrolle entsprach einer Aufteilung von 71,76% (+/-11,94) in ruhende, 17,9% (+/-7,25) in amöboide und 10,53% (+/-6,3) in Riesenzellen.

### **3.2.3 Größenverteilung der Mikroglia nach SÖ für 48 Stunden**

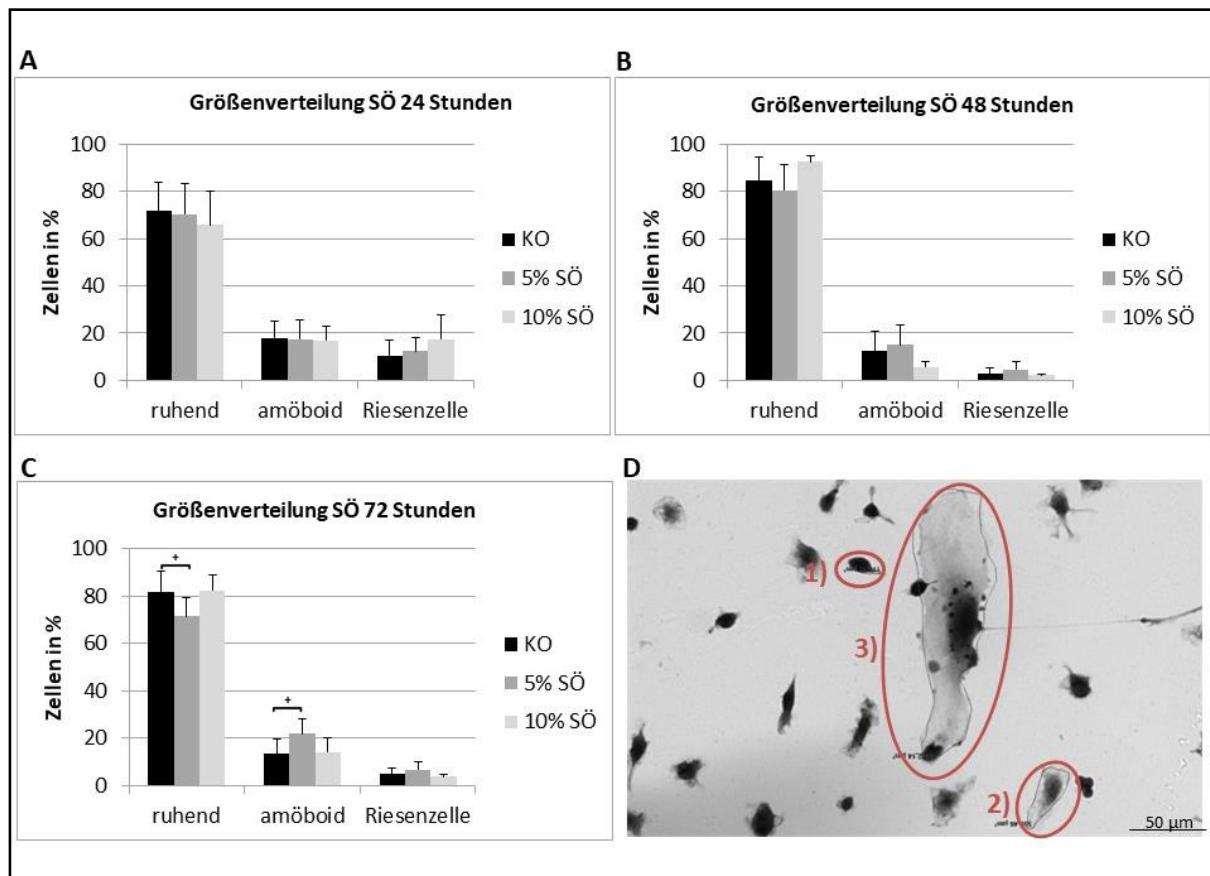
Nach einer Verlängerung der Experimentdauer auf 48 Stunden Inkubation zeigte sich nach Auswertung von 9.256 Mikrogliazellen (5% SÖ, 10% SÖ, KO) kein signifikanter Unterschied der Größenverteilung zwischen den Experimenten und der dazugehörigen Kontrolle (Abb.7.B). Bei 5% SÖ ergab die Auswertung einen Anteil von 80,38% (+/-10,82) an ruhenden, von 14,98% (+/-8,46) an amöboiden und von 4,62% (+/-3,19) an Riesenzellen. Bei den entsprechenden Experimenten mit 10% SÖ zeigte sich eine Aufteilung von 92,34% (+/-2,44) in die Gruppe der ruhenden, von 5,56% (+/-2,17) in die Gruppe der amöboiden und von 2,1% (+/-0,64) in die Gruppe der Riesenzellen. Die Verteilung der Kontrolle entsprach einem Anteil von 84,56% (+/-9,80) ruhender, 12,26% (+/-8,46) amöboider und 2,96% (+/-2,36) Riesenzellen.

### **3.2.4 Größenverteilung der Mikroglia nach SÖ für 72 Stunden**

Bei einer Experimentdauer von 72 Stunden wurden erstmalig Veränderungen der Größenverteilung signifikant. Die Ausmessung von insgesamt 20.212 Mikroglia (5%, 10% und KO) nach 72 Stunden zeigte bei 5% SÖ eine leichte Verringerung ( $p<0,05$ ) der ruhenden bei Zunahme der amöboiden Zellen (Abb.7.C). Der Anteil von ruhenden Zellen sank auf 71,47% (+/-7,7) im Vergleich zur Kontrolle mit 81,96% (+/-8,66). Der Anteil der amöboiden Mikroglia erhöhte sich auf 21,78% (+/-6,17) im Vergleich zum Kontrollwert von 13,32% (+/-6,26). Die Anzahl der Riesenzellen bei 5% SÖ entsprach 6,65% (+/-3,24). Dieser Wert stellte sich gegenüber der Kontrolle mit 4,72% (+/-2,79) als nicht signifikant verändert dar.

Bei den entsprechenden Versuchen mit 10% SÖ zeigten sich keine Signifikanzen (Abb.7.C). Bei 10% SÖ zeigte sich ein Anteil von 82,48% (+/-6,45) an ruhenden, von 14,01% (+/-6,3) an

amöboiden und von 3,66% (+/-0,91) an Riesenzellen. Die Zellen der Kontrolle teilten sich zu 82,99% (+/-7,55) in ruhende, zu 12,67% (+/-6,06) in amöboide und zu 4,33% (+/-2,07) in Riesenzellen auf.

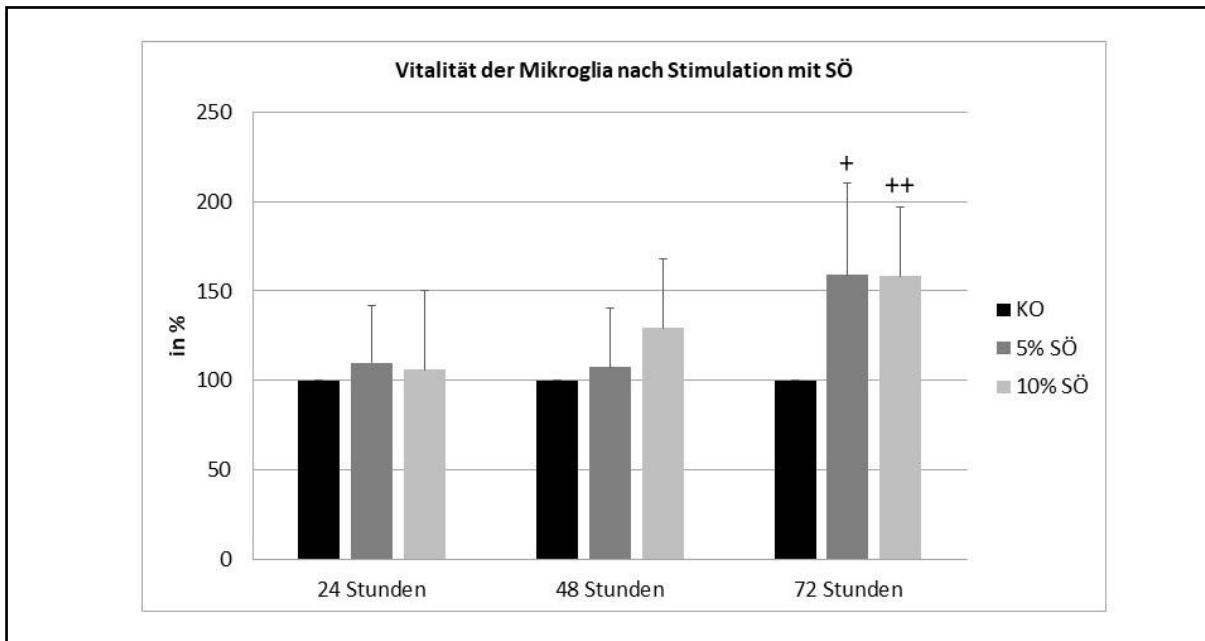


**Abbildung 7:** Größenverteilung der retinalen Mikroglia nach Inkubation mit Silikonöl (SÖ). A) 24 Stunden Inkubation mit SÖ im Medium und unbehandeltem Medium als Kontrolle (KO) und B) 48 Stunden Inkubation mit SÖ und unbehandeltem Medium als KO und C) 72 Stunden Inkubation mit SÖ und unbehandeltem Medium als KO. D) Exemplarisches Größenbeispiele für 1) ruhende ( $100\text{--}500 \mu\text{m}^2$ ), 2) amöboider ( $500\text{--}1000 \mu\text{m}^2$ ) und 3) Riesenzelle ( $> 1000 \mu\text{m}^2$ ), X-Achse zur Einteilung nach Größe, Y-Achse als Anteil der Zellen in %. In den Graphen werden KO (schwarz) und Experimente mit 5% SÖ (grau) und 10% SÖ (hellgrau) dargestellt. Die Signifikanzen wurden mithilfe des Student's t-test bestimmt mit +  $p < 0,05$ ; ++  $p < 0,01$ ; +++  $p < 0,001$ . Die Daten wurden 2020 in Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol veröffentlicht (Klettner et al. 2020).

### 3.3 Vitalitätstestung von Silikonöl auf retinale Mikroglia

In dem getesteten Zeitintervall von 24-72 Stunden zeigte sich im Vitalitäts-Assay keine toxische Wirkung durch das silikonhaltige Medium (1% (Daten nicht dargestellt), 5% und 10%) auf retinale Mikroglia (Abb.8). Stattdessen war nach 72 Stunden Inkubation mit silikonhaltigem Medium eine Signalerhöhung auffällig. Bei Inkubation mit 5% SÖ für 72 Stunden erhöhte ( $p < 0,05$ ) sich das Signal im Vergleich zur Kontrolle auf 158,96% (+/-51,41). Bei Inkubation

mit 10% SÖ für 72 Stunden erhöhte ( $p<0,01$ ) sich das Signal im Vergleich zur Kontrolle auf 158,27% (+/-38,38).



**Abbildung 8:** Ergebnisse der Vitalitätstestung im MTT-Assay mit Silikonöl (SÖ) im Medium für 24-72 Stunden im Verhältnis zur Kontrolle (KO) mit unbehandeltem Medium. Die Kontrollen wurden als 100%-Wert definiert. X-Achse mit Zeitintervallen von 24, 48 und 72 Stunden und Y-Achse in %. In den Graphen werden KO (schwarz) und Experimente mit 5% SÖ (grau) und 10% SÖ (hellgrau) dargestellt. Die Signifikanzen wurden mithilfe des Student's t-test bestimmt mit +  $p < 0,05$ ; ++  $p < 0,01$ ; +++  $p < 0,001$ . Die Daten wurden 2020 in Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol veröffentlicht (Klettner et al. 2020).

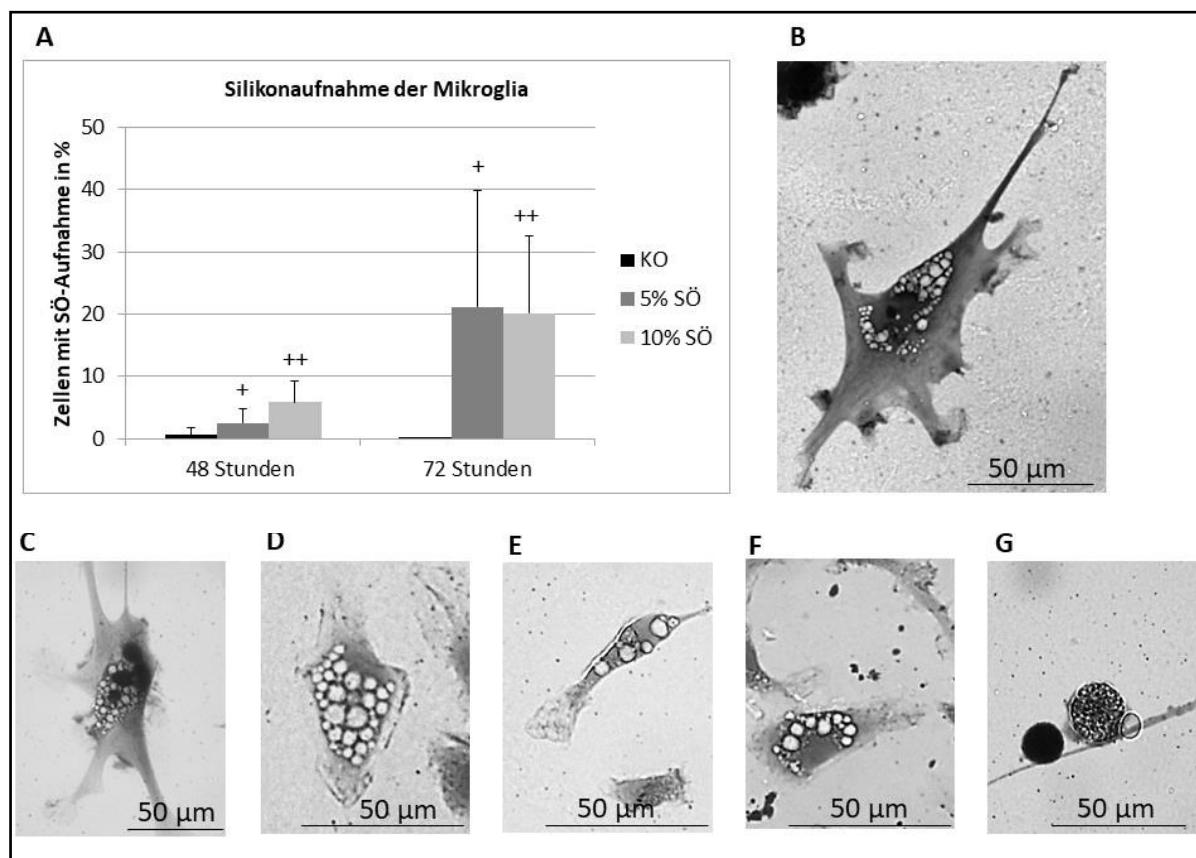
### 3.4 Aufnahme von Silikonöl durch retinale Mikroglia

Nach 24 Stunden Inkubation der retinalen Mikroglia mit 5% und 10% SÖ konnte durch mikroskopische Auswertung unter Anwendung der Kriterien (siehe 2.2.7) keine Aufnahme des Silikonöls durch die retinalen Mikroglia gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Nach Verlängerung der Inkubationsdauer auf 48 Stunden zeigte sich erstmalig eine signifikante Aufnahme des Silikonöls in die Zellen für 5% SÖ ( $p<0,05$ ) und 10% SÖ ( $p<0,001$ ). Bei Inkubation mit 5% SÖ erfüllten 34 der analysierten Mikroglia ( $n=1387$ ) die Kriterien zur Silikonaufnahme. Das bedeutet, dass 2,48% (+/-2,35) der ausgewerteten Zellen Silikonöl phagozytiert hatten (Abb.9.A). Nach Inkubation mit 10% SÖ erfüllten 81 der ausgewerteten Mikroglia ( $n=1237$ ) die Kriterien zur Aufnahme. Das bedeutet, dass 5,87% (+/-3,42) der untersuchten Mikroglia Silikonöl aufgenommen hatten (Abb.9.A). In den unbehandelten Kontrollen erfüllten 9 der ausgezählten Mikroglia ( $n=1352$ ) die Kriterien zur Aufnahme des Silikonöls. Dies entsprach einem Anteil von 0,54% (+/-1,20).

Nach 72 Stunden nahm der Anteil an Mikrogliazellen mit sichtbaren Silikoneinschlüssen weiter zu. Es konnte eine Steigerung der Aufnahme nach Inkubation mit 5% ( $p<0,05$ ) und 10% ( $p<0,001$ ) silikonhaltigem Medium gezeigt werden. Bei Inkubation mit 5% SÖ erfüllten 759 ( $n=2242$ ) ausgewerteten Zellen die Kriterien zur Aufnahme von Silikonöl. Das bedeutet, dass 21,13% (+/-18,81) der untersuchten Mikroglia Silikonöl aufgenommen hatten. Bei Inkubation mit 10% SÖ erfüllten 399 ( $n= 1789$ ) der ausgezählten Zellen die Kriterien zur Aufnahme von Silikonöl, sodass 20,17% (+/-12,48) der Mikrogliazellen Silikonöl phagozytiert hatten. Eine Zelle ( $n=2310$ ) der Kontrollexperimente erfüllte die Kriterien zur Silikonaufnahme ebenfalls. Dies entsprach einem Anteil von 0,04% (+/-0,11) in der Kontrolle.

Zusammenfassend konnte durch die mikroskopische Analyse eine Aufnahme des Silikonöls durch die retinalen Mikroglia gezeigt werden (siehe Beispielbilder Abb.9). Der Anteil der Zellen mit Silikoneinschlüssen nahm mit steigender Inkubationszeit mit Silikonöl zu.



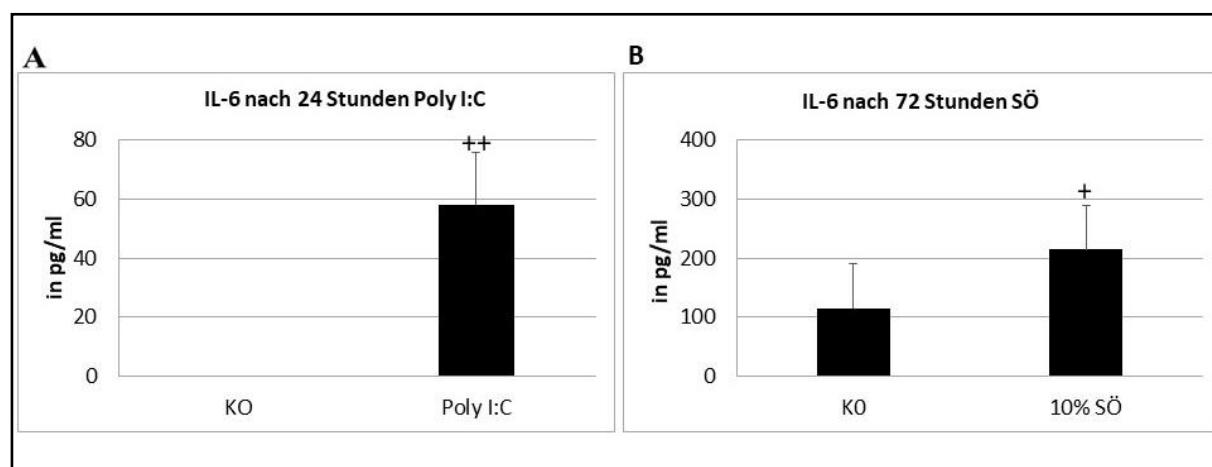
**Abbildung 9:** Silikonöl (SÖ)-Aufnahme und Beispielbilder der retinalen Mikroglia. A) Aufnahme von SÖ mit X-Achse mit Zeitintervallen von 48 und 72 Stunden und Y-Achse Anteil an Zellen mit Einschlüssen in %. In den Graphen werden die Kontrollen (KO, schwarz) und Experimente mit 5% SÖ (grau) und 10% SÖ (hellgrau) dargestellt. Die Signifikanzen wurden mithilfe des Student's t-test bestimmt mit +  $p < 0,05$ ; ++  $p < 0,01$ ; +++  $p < 0,001$ . B) -G) Beispiel-Fotos von Mikrogliazellen mit Einschlüssen. G) Beispiel für inaktive Zelle mit SÖ-Einschlüssen (rechts) im Vergleich zur inaktiven Zelle ohne Einschlüsse (links) (siehe Kriterien 2.2.7). Die Daten und Aufnahme B) wurden 2020 in Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol veröffentlicht (Klettner et al. 2020).

### 3.5 Sekretion von Zytokinen durch retinale Mikroglia nach Silikonöl-Exposition

#### 3.5.1 IL-6

Die Konzentration von IL-6 in der Positivkontrolle stieg signifikant an. Nach 24 Stunden Inkubation mit Poly I:C erhöhte ( $p<0,01$ ) sich die Sekretion von IL-6 durch die Mikroglia auf 58,15 pg/ml (+/-17,67) gegenüber der unbehandelten Kontrolle mit 0 pg/ml (Abb.10.A).

In den Mikroglia-Überständen nach Inkubation mit 10% silikonhaltigem Medium für 24-48 Stunden und den dazugehörigen unbehandelten Kontrollen war kein IL-6 messbar (Daten nicht dargestellt). Nach Verlängerung der Experimentdauer auf insgesamt 72 Stunden zeigte sich eine signifikante Zunahme ( $p<0,05$ ) der IL-6-Konzentration bei 10% SÖ im Vergleich zur Kontrolle (Abb.10.B). Die Konzentration von IL-6 betrug in der Probe mit 10% SÖ für 72 Stunden 214,44 pg/ml (+/-73,66). Die Konzentration von IL-6 betrug in der Kontrolle 114,78 pg/ml (+/-75,6). Dies entsprach einer Zunahme des Sekretionsniveaus von IL-6 bei 10% SÖ für 72 Stunden auf 253,59% (+/-129,59) gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

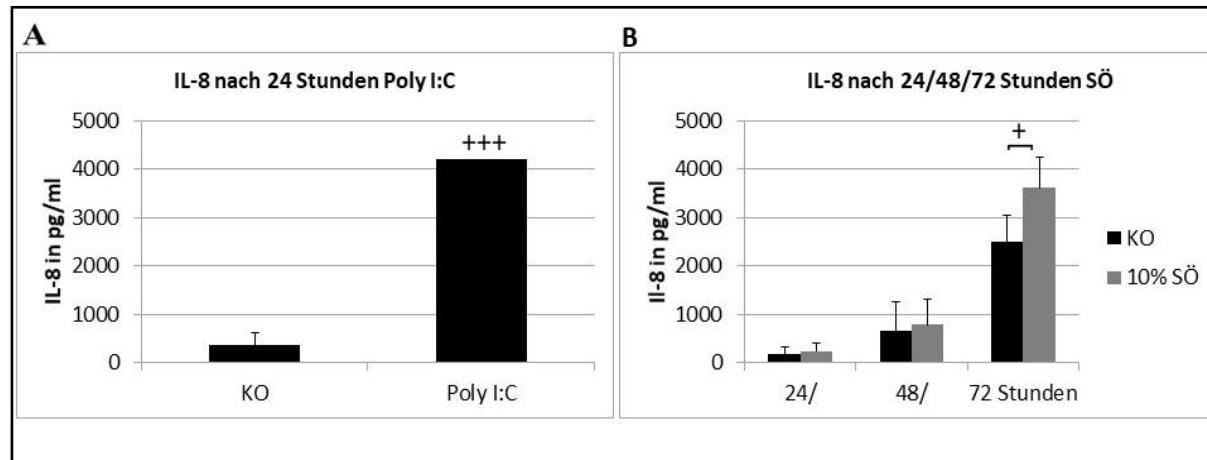


**Abbildung 10:** Interleukin 6 (IL-6) Konzentration im ELISA bei A) Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C) 100 µg/ml für 24 Stunden und Kontrolle (KO) und B) 10% Silikonöl (SÖ) und KO für 72 Stunden (SÖ 10% für 24 Stunden und 48 Stunden aufgrund fehlender Sekretion nicht graphisch dargestellt). X-Achse mit Einteilung in KO, Poly I:C und 10% SÖ. Y-Achse zur Angabe der IL-6-Konzentration der Überstände in pg/ml. Die Signifikanzen wurden mithilfe des Student's t-test bestimmt mit +  $p < 0,05$ ; ++  $p < 0,01$ ; +++  $p < 0,001$ . Die Daten wurden 2020 in Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol veröffentlicht (Klettner et al. 2020).

### 3.5.2 IL-8

Die Konzentration von IL-8 in der Positivkontrolle stieg signifikant an. Nach 24 Stunden Inkubation mit Poly I:C erhöhte sich die Sekretion der Mikroglia auf 4166,875 pg/ml (+/-0) (höchste messbare Konzentration) gegenüber der unbehandelten Kontrolle mit 353,058 pg/ml (+/-263,92) (Abb.11.A). Auch in den Überständen (10% SÖ und KO) war zu jedem getesteten Zeitpunkt IL-8 nachzuweisen. Nach 24 Stunden zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Abb.11.B). Die Konzentration betrug bei 10% SÖ 230,46 pg/ml (+/-178,11) und bei der Kontrolle 161,45 pg/ml (+/-155,49). Nach Verlängerung der Inkubationsdauer auf 48 Stunden betrug die Konzentration von IL-8 bei 10% SÖ 779,89 pg/ml (+/-521,34) und bei der Kontrolle 649,10 pg/ml (+/-606,68). Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen (Abb.11.B).

Nach 72 Stunden zeigte sich erstmalig eine signifikante Zunahme der Sekretion von IL-8 bei 10% SÖ gegenüber der Kontrolle (Abb.11.B). Die Konzentration von IL-8 bei 10% SÖ für 72 Stunden betrug 3609,21 pg/ml (+/-637,83). Die Konzentration von IL-8 betrug in der Kontrolle 2485,49 pg/ml (+/-544,59). Dies entsprach einer Zunahme des Sekretionsniveaus von IL-8 bei 10% SÖ für 72 Stunden auf 120,2% (+/-149,504) im Vergleich zur Kontrolle.

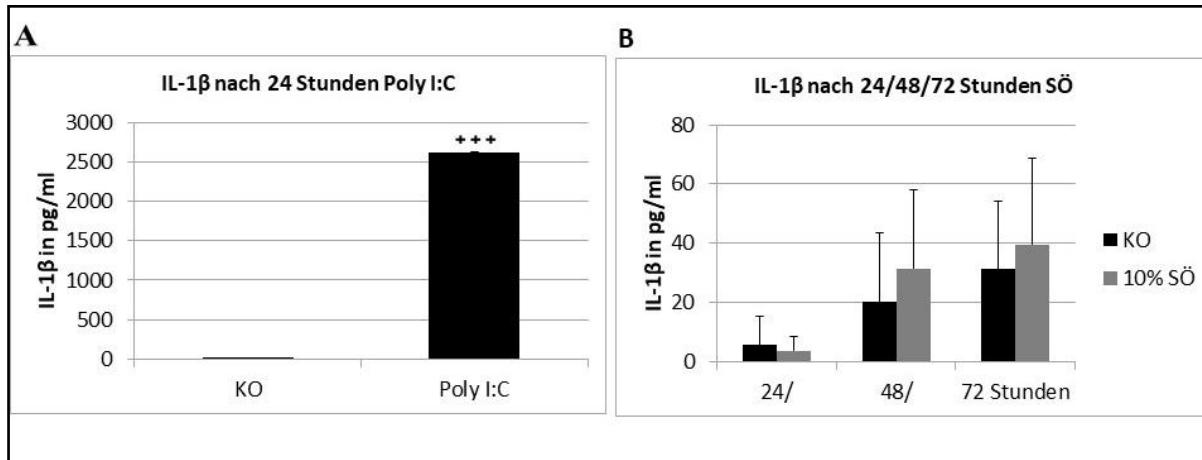


**Abbildung 11:** Interleukin 8 (IL-8) Konzentration im ELISA bei A) Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C) 100 µg/ml für 24 Stunden und Kontrolle (KO) und B) 10% Silikonöl (SÖ) und KO für 24-72 Stunden. X-Achse mit A) Einteilung in KO und Poly I:C und B) Einteilung in die Zeitintervalle 24, 48 und 72 Stunden. Y-Achse zur Angabe der IL-8-Konzentration der Überstände in pg/ml. Die Signifikanzen wurden mithilfe des Student's t-test bestimmt mit + p < 0,05; ++ p < 0,01; +++ p < 0,001. Die Daten wurden 2020 in Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol veröffentlicht (Klettner et al. 2020).

### 3.5.3 IL-1 $\beta$

Die Konzentration von IL-1 $\beta$  in der Positivkontrolle stieg signifikant an. Nach 24 Stunden Inkubation mit Poly I:C konnte die Sekretion des gesuchten Zytokins durch die retinalen Mikroglia stark gesteigert werden ( $p<0,001$ ) (Abb.12.A). Der Wert der Positivkontrolle entsprach mit 2.623,045 pg/ml (+/-0) der höchsten messbaren Konzentration. In der Kontrolle wurde mit 1,22 pg/ml (+/-1,57) ein wesentlich geringerer Wert nachgewiesen. Bei Auswertung der Experimente (10% SÖ) und dazugehörigen Kontrollen konnte im gesamten Zeitintervall von 24-72 Stunden nur ein geringes Sekretionsniveau gemessen werden. Zu keinem untersuchten Zeitpunkt konnte ein signifikanter Unterschied der Sekretion von IL-1 $\beta$  dargestellt werden (Abb.12.B).

Nach 24 Stunden Inkubation betrug die Konzentration des Zytokins in den Mikroglia-Überständen bei Inkubation mit 10% SÖ 3,75 pg/ml (+/-4,77) und in der Kontrolle 5,6 pg/ml (+/-9,7). Nach Verlängerung der Experimentdauer auf 48 Stunden betrug die Sekretion von IL-1 $\beta$  31,39 pg/ml (+/-26,68) bei Inkubation mit 10% SÖ und 20,13 pg/ml (+/-23,33) in der unbehandelten Kontrolle. Nach 72 Stunden stieg die Konzentration von IL-1 $\beta$  bei 10% SÖ 39,6 pg/ml (+/-28,95) und in der Kontrolle 31,21 pg/ml (+/-22,87).

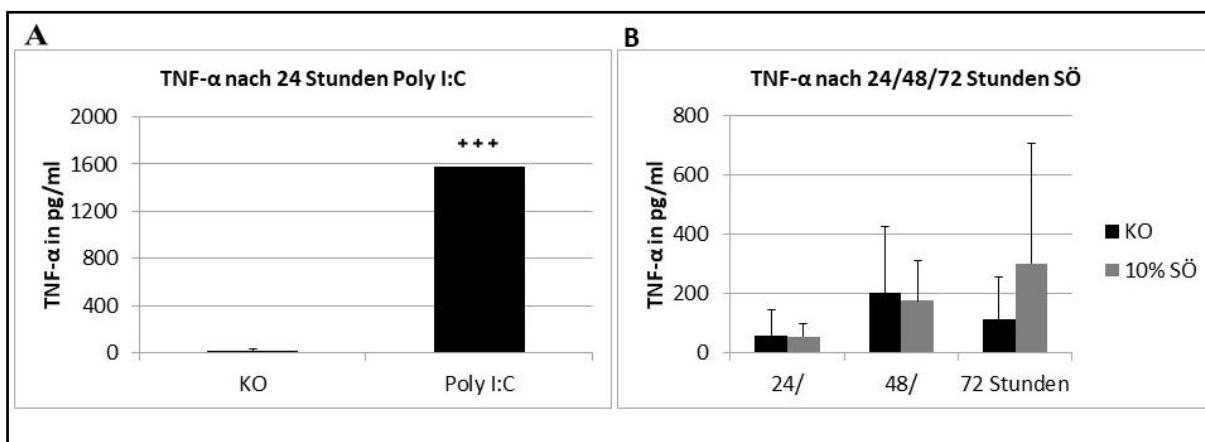


**Abbildung 12:** Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) Konzentration im ELISA bei A) Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C) 100  $\mu$ g/ml für 24 Stunden und Kontrolle (KO) und B) 10% Silikonöl (SÖ) und KO für 24-72 Stunden. X-Achse mit A) Einteilung in KO und Poly I:C und B) Einteilung in die Zeitintervalle 24, 48 und 72 Stunden. Y-Achse zur Angabe der IL-8-Konzentration der Überstände in pg/ml. Die Signifikanzen wurden mithilfe des Student's t-test bestimmt mit +  $p < 0,05$ ; ++  $p < 0,01$ ; +++  $p < 0,001$ . Die Daten wurden 2020 in Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol veröffentlicht (Klettner et al. 2020).

### 3.5.4 TNF- $\alpha$

Die Mikroglia der Positivkontrolle reagierten auf die Stimulation mit Poly I:C innerhalb von 24 Stunden mit einer starken Zunahme der Sekretion ( $p<0,001$ ) von TNF- $\alpha$ . Der Unterschied der Konzentrationen von 1573,83 pg/ml (+/-0) (höchster messbarer Wert) bei Stimulation mit Poly I:C und 15,77 pg/ml (+/-22,3) in der Kontrolle war deutlich ausgeprägt (Abb.13.A). Die Auswertung der Experimente nach 24-72 Stunden Inkubation mit 10% SÖ und den unbehandelten Kontrollen ergaben nur geringe Konzentrationen von TNF- $\alpha$  in den Mikroglia-Überständen. Es konnten im gesamten getesteten Zeitintervall keine signifikanten Unterschiede aufgedeckt werden (Abb.13.B).

Nach 24 Stunden zeigte sich eine Konzentration des gesuchten Zytokins von 55,20 (+/-45,2) bei 10% SÖ und 60,49 pg/ml (+/-83,29) in der dazugehörigen Kontrolle (Abb.13.B). Bei Verlängerung der Experimentdauer auf 48 Stunden betrug die Konzentration von TNF- $\alpha$  bei 10% SÖ 175,13 pg/ml (+/-133,90) und in der Kontrolle 201,48 pg/ml (+/-223,13). Nach 72 Stunden betrug die Konzentration von TNF- $\alpha$  bei Inkubation mit 10% SÖ 302,16 pg/ml (+/-402,66) und in der Kontrolle 115,38pg/ml (+/-138,13).



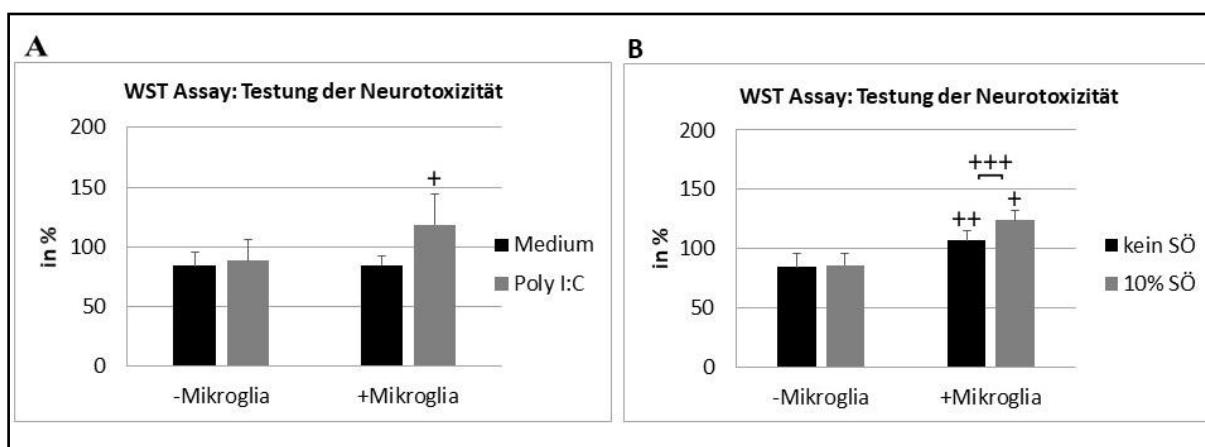
**Abbildung 13:** Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) Konzentration im ELISA mit A) Polyinosinsäure-Polycytidylsäure (Poly I:C) 100  $\mu$ g/ml für 24 Stunden und Kontrolle und B) 10% SÖ (Silikonöl) und KO (Kontrolle) für 24-72 Stunden. X-Achse mit A) Einteilung in KO und Poly I:C und B) Einteilung in die Zeitintervalle 24, 48 und 72 Stunden. Y-Achse zur Angabe der IL-8-Konzentration der Überstände in pg/ml. Die Signifikanzen wurden mithilfe des Student's t-test bestimmt mit +  $p < 0,05$ ; ++  $p < 0,01$ ; +++  $p < 0,001$ . Die Daten wurden 2020 in Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol veröffentlicht (Klettner et al. 2020).

### 3.6 Neurotoxizität durch Mikroglia-Überstände nach 10% SÖ

In der Auswertung des WST-1-Assays der Positivkontrolle (24 Stunden Medium mit Poly I:C und Mikroglia) war keine Toxizität auf die neuronalen Zellen zu erkennen (Abb.14.A). Es fiel eine signifikante Signalerhöhung im WST-Assay ( $p<0,05$ ) auf. Das Signal war auf 118,73%

( $+/-25,05$ ) gegenüber der Kontrolle gesteigert. Die Inkubation der PC12-Zellen mit Mikroglia-Überständen nach 24 Stunden Inkubation mit unbehandeltem Medium führte zu keiner signifikanten Veränderung (Abb.14.A). Das ausgelesene Signal entsprach 84,39% ( $+/-17,28$ ) der Kontrolle. Auch die direkte Stimulation der neuronalen Zellen mit Poly I:C mit Medium ohne Inkubation mir Mikroglia ergab keine Signifikanzen. Das Signal lag bei 88,36% ( $+/-8,1$ ) des Kontrollssignals.

Die Inkubation der PC12-Zellen mit Überständen von Mikroglia-Überständen nach 72 Stunden Inkubation mit silikonhaltigem Medium (10%) führte zu einer signifikanten Signalsteigerung (Abb.14.B). Vergleichend mit der Medium-Kontrolle (ohne Mikroglia) zeigte sich eine Steigerung ( $p<0,05$ ) des Signals auf 124,01% ( $+/-8,00$ ). Die Inkubation der PC12-Zellen mit den Mikroglia-Überständen nach 72 Stunden Inkubation mit unbehandeltem Medium ergab ebenfalls einer Signalsteigerung ( $p<0,01$ ) im WST-Assay auf 106,69% ( $+/-8,49$ ) im Vergleich zum Kontrollsignal. Die Signalerhöhung nach Inkubation der PC12-Zellen mit Mikroglia-Überständen mit silikonhaltigem Medium (10% SÖ) erwies sich im Vergleich zur Signalerhöhung der PC12-Zellen nach Inkubation mit Mikroglia-Überständen mit unbehandeltem Medium als signifikant erhöht ( $p<0,05$ ). Die Inkubation der PC12-Zellen mit Überständen mit silikonhaltigem Medium (10% SÖ) ohne Mikroglia führte zu keinen signifikanten Veränderungen. Das Signal entsprach 86,12% ( $+/-9,72$ ) des Kontrollssignals (Abb.14.B).



**Abbildung 14:** WST-Assay an neuronalen PC12-Zellen für A) Positivkontrolle und Proben und B) Experimente mit 10% Silikonöl (SÖ) und Kontrolle (KO). X-Achse in % (ausgelesenes Signal im WST-Assay gegenüber Kontrollsignal mit Medium). Y-Achse als Einteilung der Proben nach Inkubation mit und ohne Mikroglia. In den Graphen werden die Kontrollen (schwarz) und Experimente in A) Polyinosinsäure-Polycytidylsäure (Poly I:C, grau) und B) 10% SÖ (grau) farblich dargestellt. Die Signifikanzen wurden mithilfe des Student's t-test bestimmt mit +  $p < 0,05$ ; ++  $p < 0,01$ ; +++  $p < 0,001$  gegen Kontrolle (PC12-Zellen mit Mikroglia-Medium) bzw. mit +  $p < 0,05$ ; ++  $p < 0,01$ ; +++  $p < 0,001$  gegen Experiment (PC12-Zellen mit Mikroglia-Überständen). Die Daten wurden 2020 in Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol veröffentlicht (Klettner et al. 2020)

## **4. Diskussion**

### **4.1 Vorbemerkung**

Eine Silikonöltamponade stellt eine wichtige Therapieform für Netzhautablösungen unterschiedlichster Ätiologie dar. Durch eine Vitrektomie mit folgender Silikonöltamponade soll die Wiederanlage der neurosensorischen Retina an das RPE erreicht werden, um eine Degeneration und das Absterben der Retina zu verhindern (Ghazi und Green 2002). Zu den häufigen Indikationen dieses Verfahrens zählen komplizierte Retinaablösungen (Shen und Yang 2007) und proliferative Vitreoretinopathien (Schwartz et al. 2014). Obwohl Silikonöl aufgrund seiner Eigenschaften (Lucke et al. 1987; Inoue et al. 2009; Morescalchi et al. 2014) als passendes Material zur Endotamponade gilt, kommt es bei 20- 30% der Patienten zu irreversiblen Sehverlusten (Tode et al. 2016; Christensen und La Cour 2012; Scheerlinck et al. 2016). Der Pathomechanismus der Sehverluste ist aktuell noch unbekannt, allerdings fällt bei den Betroffenen eine assoziierte Verringerung der inneren Retinaschichten auf. Als Ursache für die gemessene Verringerung der Retinadicke und damit als Korrelat für die auftretenden Sehverluste wird ein Verlust an neuronalen Zellen wie den Ganglienzellen diskutiert (Tode et al. 2016; Christensen und La Cour 2012). Eine bekannte Komplikation der Silikonöltamponade ist die Emulsionsbildung (Miller et al. 2014; Grzybowski et al. 2014). Besonders durch Augen- und Kopfbewegungen provozierte Scherkräfte fördern die Emulsionsbildung (Chan, Y. K., Ng, C. O., Knox, P. C., Garvey, M. J., Williams, R. L., Wong, D. 2011). Als Folge der Emulsionsbildung kann es zur Infiltration des Gewebes mit Silikonöl kommen (Wickham et al. 2007; Mrejen et al. 2014; Odrobina und Laudańska-Olszewska 2014; Eckle et al. 2005). Zu welchen Wechselwirkungen es mit dem emulgierten Silikonöl auf der zellulären Ebene kommt, ist größtenteils noch unbekannt. Dieser Thematik widmet sich die vorliegende Arbeit. Das Ziel ist die Untersuchung potentieller Interaktionen zwischen primären porcinen retinalen Mikrogliazellen und emulgierten Silikonöl. In diesem Zusammenhang wird die Hypothese verfolgt, dass durch diese Interaktionen eine Mikroglia-vermittelte Entzündungsreaktion mit neurotoxischen Effekten initiiert werden kann.

### **4.2 Folgen der Interaktion von Silikonöl mit den retinalen Mikroglia**

Die Interaktion zwischen dem emulgierten Silikonöl und den Mikroglia wurde an primären porcinen retinalen Mikroglia getestet. Die Reinheit der in dieser Arbeit verwendeten Mikrogliakulturen wurde mithilfe der Iba1-Färbung (Graeber und Streit 2010; Klettner et al. 2014) bestimmt. Im Durchschnitt handelte es sich bei nachweislich 91,5 % der geernteten

Zellen um retinale Mikroglia. Neben einer Kontamination durch andere Zellarten kann dieses Ergebnis auch durch apoptotische Mikrogliazellen beeinflusst werden (Cai et al. 2011). Denn eine Kernfärbung der im Prozess des Zelltodes befindlichen Zellen kann aufgrund eines ähnlichen Färbverhaltens eine Kontamination vortäuschen. Morphologisch wie auch funktionell können Mikroglia in unterschiedlichen Zuständen vorliegen. Die ruhenden Mikroglia zeichnen sich durch kleine Zellkörper mit zahlreichen Ausläufern zur Kontrolle der lokalen Umgebung und der Kommunikation aus (Nimmerjahn et al. 2005). Sie können innerhalb kürzester Zeit auf pathologische Reize reagieren und über eine phänotypische Transformation im Rahmen der Aktivierung eine amöboide Zellform annehmen (Streit 2002; Boche et al. 2013; Hornik et al. 2014). Durch die Aktivierung kann die Sekretion proinflammatorischer Zytokine sowie die Phagozytose- und Mitoserate gesteigert werden (Langmann 2007). Dabei fällt die Reaktion der Mikroglia abhängig von dem auslösenden Reiz und der Dauer des Reizes differenziert aus (Lull und Block 2010). Zur Untersuchung potentieller Interaktionen wurden die retinalen Mikroglia mit silikonhaltigem Medium (5% und 10%) inkubiert. Wie auch in der Literatur beschrieben wurde das Silikonöl per Ultraschall im Mikroglia-Medium emulgiert (Caramoy et al. 2009).

Die Ergebnisse dieser Arbeit wiesen deutlich eine Interaktion zwischen emulgierten Silikonöl und retinaler Mikroglia nach. Es zeigte sich dabei eine zeitabhängige Steigerung der Effekte über 72 Stunden. Innerhalb dieses Zeitintervalls gelang es, erstmalig eine Aufnahme des emulgierten Silikonöls durch die retinalen Mikroglia zu zeigen. Die Aufnahme des Silikonöls war von metabolischen Veränderungen und einer gesteigerten Sekretion von IL-6 und IL-8 durch die retinalen Mikroglia begleitet. Es ergab sich jedoch keine relevante Veränderung in der Größenverteilung der Zellen in ruhende, amöboide und Riesenzelle. Die Ergebnisse der silikonbehandelten Mikroglia unterschied sich damit maßgeblich von den Ergebnissen der Positivkontrolle mit Poly I:C. Als Ligand des *Toll-like* Rezeptor 3 löst Poly I:C eine gesicherte proinflammatorische Antwort der retinalen Mikroglia aus (Town et al. 2006). In den Versuchen führte es zu einer Sekretionssteigerung aller untersuchten Zytokine (IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ ). Im Vergleich fiel die Reaktion der Mikroglia auf das Silikonöl zwar schwächer aus als in der Positivkontrolle, aber unterschied sich trotzdem auffällig von der unbehandelten Kontrolle. Diese Ergebnisse decken sich mit der Annahme, dass die Reaktion der Mikroglia je nach auslösendem Stimulus unterschiedlich ausfällt (Lull und Block 2010; Block und Hong 2005). Die Sekretionssteigerung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 (Horn et al. 2009) spricht für eine differenzierte proinflammatorische Reaktion der Mikroglia auf das emulierte

Silikonöl. Auffällig ist, dass die klassischen neurotoxischen Zytokine IL-1 $\beta$  (Ye et al. 2013; Wooff et al. 2019; Natoli et al. 2017; Rossi et al. 2014a) und TNF- $\alpha$  (Kitaoka et al. 2006; Ye et al. 2013) innerhalb des untersuchten Zeitintervalls kaum sezerniert worden sind. Diese Feststellung unterstützt die Hypothese, dass die Mikroglia-vermittelte Neurotoxizität streng kontrolliert wird, um das differenzierte neuronale Gewebe zu schützen (Ma et al. 2002). Innerhalb von 72 Stunden wirkt Silikonöl nicht als ausreichender Stimulus für eine Sekretionssteigerung der Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ . Im Gegensatz dazu wird IL-6 in verschiedenen Modellen auch eine neuroprotektive Wirkung zugesprochen (Fang et al. 2013; Chucair-Elliott et al. 2014; Spittau et al. 2012; Sappington et al. 2006; Leibinger et al. 2013). Im Auge schützt IL-6 laut Sappington et al. die Ganglienzellen vor der Apoptose und unterstützt die Regeneration der Axone (Sappington et al. 2006). Im Gegensatz dazu vertreten andere Autoren eine konträre Meinung (Fisher et al. 2001; Echevarria et al. 2017). Echevarria et al. stuften IL-6 als Bestandteil eines Mechanismus ein, welcher zur strukturellen Degeneration von Axonen der Ganglienzellen führt (Echevarria et al. 2017). Demnach kann IL-6 je nach Modell und Zusammenspiel mit weiteren Zytokinen protektiv oder schädigend auf Neurone wirken. Dies soll vom Signalweg abhängen (Rothaug et al. 2016). Der sogenannte klassische Signalweg soll regenerativ auf neuronales Gewebe, ein alternativer Signalweg über „*trans-signaling*“ dagegen degenerativ wirken (Rothaug et al. 2016). Passend zu den Ergebnissen dieser Arbeit konnten auch Asaria et al. eine Zunahme von IL-6 im *retro silicon oil fluid* darstellen (Asaria et al. 2004). Auch IL-8 gehört zu den proinflammatorischen Zytokinen und ist als Chemokin für die Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen, wie auch den retinalen Mikrogliazellen, zuständig (Semple et al. 2010; Cross und Woodroffe 1999). Daneben wird in der Literatur auch von einer direkten neurotoxischen Wirkung von IL-8 über die Freisetzung von Neurotoxinen und die Induktion des Zellzyklus und pro-apoptotischer Proteine berichtet (Thirumangalakudi et al. 2007). Im Organsystem des Auges ist zusätzlich eine Korrelation erhöhter IL-8-Spiegel mit dem Auftreten akuter Sehverluste und Dysfunktionen nach Entzündungen des Sehnervs aufgefallen (Rossi et al. 2014b). Laut Rossi et al. spielt IL-8 eine besondere Rolle im Pathomechanismus der Inflammation, Demyelinisierung und Neurodegeneration nach einer Sehnervenentzündung (Rossi et al. 2014b). Inwiefern IL-8 auch am Pathomechanismus der irreversiblen Sehverluste bei Silikonöltamponade beteiligt sein könnte, ist aktuell jedoch noch unbekannt. Um diese Frage besser zu beantworten, wäre eine klinische Analyse der IL-8-Spiegel im Kammerwasser von Patienten mit Silikonöltamponaden in Korrelation zum Auftreten von Sehverluste von großem Interesse. Diese Untersuchung

könnte unter Umständen hilfreich sein, um die Bedeutung von IL-8 im Rahmen der irreversiblen Sehverluste besser verstehen zu können. Auch Shimizu et al. vermuteten einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der unerklärten Sehverluste und Zytokinveränderungen in Flüssigkeitsansammlungen zwischen Retina und Silikonöltamponade (*subsilicone oil fluid, SOF*). Sie konnten eine Zunahme von IL-8 im *SOF* im Vergleich zu Proben aus der Vorderkammer zeigen (Shimizu et al. 2019). Da es bereits in Bezug auf andere Silikonöl-assoziierte Komplikationen wie beispielsweise dem Auftreten von Glaukomen gelang, signifikante Zunahmen bestimmter inflammatorischer Zytokine (IL-17, IL-6, TNF- $\alpha$ ) zu zeigen (Liu et al. 2017), erscheint es denkbar, dass auch bei Patienten mit Silikonöl-assoziierten Sehverlusten eine Erhöhung bestimmter Zytokine auffällt. Zusammengefasst zeigte sich in der vorliegenden Untersuchung eine deutliche Interaktion zwischen retinalen Mikroglia und emulgiertem Silikonöl. Die Erhöhung von IL-6 und IL-8 spricht für eine differenzierte proinflammatorische Reaktion.

#### **4.3 Toxizität auf neuronale Zellen durch silikonbehandelte Mikroglia-Überstände**

Im zweiten Versuchsabschnitt wurde eine potentielle Neurotoxizität durch die silikoninduzierten Veränderungen der Mikroglia untersucht. Dazu wurde nach Stimulation mit den Überständen der silikonbehandelten Mikroglia ein WST-1-Assay an differenzierten PC12-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse sprechen klar gegen eine Neurotoxizität innerhalb von 48 Stunden. Stattdessen wurde über die Zunahme des Signals im WST-Assay eine Steigerung der metabolischen Aktivität der differenzierten PC12-Zellen gezeigt. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen der gemessenen Zytokinveränderungen im ersten Versuchsabschnitt, da keine erhöhte Sekretion der klassischen neurotoxischen Zytokine gemessen wurde. Die Ursache der gesteigerten metabolischen Aktivität ist allerdings nicht geklärt. Während eine neurotoxische Wirkung von IL-6 und IL-8 in den Überständen somit unwahrscheinlich erscheint, ist die Annahme einer protektiven Wirkung von IL-6 wie in der Literatur berichtet (Sappington et al. 2006) zu bedenken. Auch ein protektiver sowie antiapoptotischer Effekt von IL-6 auf die in den Versuchen verwendeten PC12-Zellen (Umegaki et al. 1996), könnte das Ergebnis beeinflussen.

Zusammengefasst zeigen die Daten beider Versuchsabschnitte eine differenzierte proinflammatorische Reaktion der retinalen Mikroglia auf das emulierte Silikonöl ohne akute neurotoxische Folgen. Bei der Übertragung der Ergebnisse in die klinische Situation zeigt sich demnach kein Anhalt für eine silikoninduzierte Toxizität durch Mikroglia innerhalb der ersten

48 Stunden einer Silikonöltamponade. Dieses Ergebnis deckt sich mit den bisherigen klinischen Berichten. Die irreversiblen Sehverluste treten nicht innerhalb von 48 Stunden, sondern erst nach Wochen bis Monaten auf (Tode et al. 2016). Um allerdings auch eine Mikroglia-vermittelte Neurotoxizität durch den chronischen Kontakt mit emulgierten Silikonöl ausschließen zu können, ist die weitere Erforschung der Fragestellung über einen längeren Zeitraum mit der Erhebung von Langzeitdaten nötig. Die gewonnenen Daten sind weiterhin mit der Hypothese kompatibel, dass eine Verlängerung der Inkubationsdauer zu einer fortschreitenden Entzündungsreaktion führen kann. Wie auch in der Literatur beschrieben begünstigt besonders die Persistenz eines Entzündungsreizes die Entstehung einer Mikroglia-vermittelten neurotoxische Reaktion (Rossi et al. 2014b; Cherry et al. 2014). Bei Vorhandensein eines chronischen Reizes können Mikroglia pathologisch aktiviert bleiben und verlängert proinflammatorische Zytokine sekretieren (Rashid et al. 2019; Lull und Block 2010). Die exzessive Sekretion von toxischen Zytokinen wird als ein möglicher Mechanismus der Mikroglia-vermittelten Neurotoxizität gesehen (Lull und Block 2010; Block und Hong 2005). So zeigen Experimente an hirnstämmigen Mikroglia, dass es bei einer chronischen Stimulation über Wochen auch bei niedrigen Dosen eines proinflammatorischen und Mikroglia-aktivierenden Faktors (in der Studie Lipopolysaccherid 5 ng/h über 2 Wochen) zu einem signifikanten Verlust von Neuronen erst nach Wochen kommen kann (Block und Hong 2005; Gao et al. 2002a; Gao et al. 2002b). Wie auch in dieser Arbeit zeigen sich in den Experimenten nach Gao et al. keine Anhaltspunkte für eine akute Neurotoxizität. (Block und Hong 2005; Gao et al. 2002a; Gao et al. 2002b). Dieses Ergebnis untermauert noch einmal die Notwendigkeit von weiteren Langzeituntersuchungen. Im weiteren Zusammenhang kann auch das sogenannte *priming* der Mikroglia die Entstehung einer neurotoxischen Reaktion beeinflussen. Zu einem *priming* der Zellen soll es beispielsweise bei persistierender Neuroinflammation (Wolf et al. 2017), Neurodegeneration oder systemischen Entzündungen kommen (Perry und Holmes 2014). Durch das *priming* wird die Empfindlichkeit gegenüber proinflammatorischen Stimuli mit folgender Bereitschaft zur Aktivierung gesteigert (Brown 2019). Als Folge des *primings* antworten die Mikroglia verstärkt und länger auf einen zweiten Reiz, sodass die Schwelle zur Neurotoxizität gesenkt wird. (Lull und Block 2010; Wolf et al. 2017). Auf diese Weise kann auch ein geringer Reiz wie selbst natürliche Alterungsvorgänge zu einer Neurodegeneration führen (Wolf et al. 2017). Übertragen in die in-vivo-Situation könnte dies bedeuten, dass es bei Patienten mit Silikonöltamponade zu einem *priming* der Mikroglia kommen kann. In Folge dessen könnte ein zusätzlicher Stimulus eine neurotoxische Reaktion auslösen. Da der Einsatz

von Silikonöltamponaden verstärkt bei komplexen Fällen (Shen und Yang 2007) und bei Patienten mit okulären Grunderkrankungen indiziert ist (Yamamoto und Takeuchi 2000; Schwartz et al. 2014), ist theoretisch auch ein bereits erfolgtes *priming* im Rahmen der vorliegenden Grunderkrankung denkbar. Bei diesen Patienten könnte die differenzierte Reaktion auf den zusätzlichen Stimulus des Silikonöls aufgrund des *primings* stärker ausfallen und so zu einer neurotoxischen Reaktion führen. Auch in Bezug auf andere Erkrankungen des ZNS wird das *priming* der Mikroglia aktuell als ein progressionsfördernder Faktor für chronisch inflammatorischer Erkrankungen diskutiert (Narayan et al. 2014; Combrinck et al. 2002; Cunningham et al. 2005). Laut der aktuellen Literatur soll insbesondere IL-6 wichtig für das *priming* der Mikroglia sein (Garner et al. 2018). Eventuell könnte die gemessene silikoninduzierte Sekretionssteigerung von IL-6 durch die retinalen Mikroglia den Vorgang des *priming* somit auch direkt beeinflussen. Diese Annahme ist jedoch rein spekulativ.

Abschließend sollte die Durchführung der Experimente an den Zellen außerhalb ihres lokalen Mikromilieus bedacht werden. Die fehlende Interaktionen mit weiteren lokalen Zellpopulationen (Kaur und Dufour 2012) kann das Ergebnis der Experimente beeinflussen. Beispielsweise können die Zytokine IL-6 und IL-8 auch zytotoxisch auf das RPE wirken (Leung et al. 2009). So könnten hypothetisch die silikoninduzierte Sekretionssteigerung der Mikroglia weitere Zellen der Retina beeinflussen. Daher scheint auch die weitere Untersuchung der Interaktion der verschiedenen Zellen von großem Interesse.

Zusammengefasst zeigen die gewonnenen Daten deutlich eine Reaktion der retinalen Mikroglia auf das emulgierte Silikonöl. Über einen Zeitraum von 72 Stunden führt diese Reaktion zu einer proinflammatorischen Reaktion mit der Sekretionssteigerung von IL-6 und IL-8. Dabei ergab sich kein Anhalt für eine akute Neurotoxizität. Ob diese Reaktion ein Teil des Pathomechanismus der unerklärten Sehverluste bei Silikonöltamponade mit Verringerung der inneren Retinaschichten ist, kann noch nicht ausreichend beantwortet werden. Die aktuellen Ergebnisse passen jedoch zu dem klinischen Verlauf der berichteten Krankheitsfälle. Da klare Interaktionen des Silikonöls und den retinalen Mikroglia gezeigt wurden, betont dies die Wichtigkeit der weiteren Erforschung der Arbeitshypothese über ein längeres Zeitintervall. Somit erscheint die Hypothese der Entstehung einer neurotoxischen Reaktion durch die chronische Interaktion von emulgierten Silikonöl und retinalen Mikroglia mit den vorliegenden Ergebnissen immer noch möglich. Mit der Erhebung von Langzeitdaten kann es eventuell gelingen die Rolle der retinalen Mikroglia im Pathomechanismus der unerklärten Sehverluste umfassender zu verstehen.

## **5. Zusammenfassung**

Silikonöltamponaden gelten in der Augenheilkunde als ein etabliertes Verfahren, um bei komplexen Retinaablösungen die Retina wieder mit dem ernährenden retinalen Pigmentepithel zu verbinden. Neben den bekannten Komplikationen der Therapie wie dem erhöhten Risiko zur Entstehung von Glaukomen oder der Emulgierung des Silikonöls und der folgenden Infiltration ins Gewebe, leiden bis zu 30% der behandelten Patienten unter Sehverlusten. Diese Sehverluste sind irreversibel. Der grundlegende Pathomechanismus ist aktuell noch ungeklärt. Auffällig ist die Assoziation zu der Verringerung der inneren Schichten der Retina, welche eventuell als Korrelat zu einem neuronalen Zelluntergang gesehen werden kann. Im Vordergrund dieser Arbeit steht die aktuell noch unklare Interaktion der retinalen Immun- und Fresszellen, den Mikroglia, mit dem emulgierten Silikonöl. Das Ziel der Arbeit war die Untersuchung des Effektes von emulgierten Silikonöl auf die retinalen Mikroglia hinsichtlich einer Aufnahme, der Veränderungen der Größenverteilung der Zellen, der Vitalität der Zellen und der Sekretion proinflammatorischer Zytokine. In einem zweiten Versuchsabschnitt wurde über ein Toxizität-Assay eine eventuelle Neurotoxizität durch die silikoninduzierten Veränderungen der Mikroglia erforscht. Die Versuche wurden an primären porcinen retinalen Mikroglia und neuronal differenzierten PC12-Zellen durchgeführt. Retinale Mikroglia haben zahlreiche Aufgaben zur Aufrechterhaltung der okulären Homöostase. In einem ruhenden Zustand kontrollieren sie das lokale Milieu und kommunizieren über zarte Ausläufer mit den umgebenden Zellen. Durch eine Aktivierung durch pathologische Reize können sie eine amöboide Form mit einer erhöhten Zytokinsekretion, Migration und Proliferationsrate annehmen. Über eine chronische Aktivierung und chronische Zytokeröhungen erscheint die Entstehung einer Mikroglia-vermittelten Neurotoxizität möglich. In den Versuchen wurde das Silikonöl im Mikroglia-Medium per Ultraschall emulgiert (5% und 10%) und für 24 bis 72 Stunden auf die Zellen aufgetragen. Mit steigender Inkubationsdauer zeigten sich signifikante Veränderungen durch den Kontakt zum Silikonöl. Nach 48 Stunden und 72 Stunden konnte eine Aufnahme des Silikonöls in die Zellen gezeigt werden. Nach 72 Stunden zeigte sich eine Sekretionssteigerung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 bei unveränderten Sekretionsniveaus für IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ . Es zeigten sich keine Veränderungen der Größenverteilung und keine direkte Toxizität durch das emulierte Silikonöl. Über die Messung einer Signalsteigerung im WST-Assay an neuronalen Zellen konnte eine Neurotoxizität innerhalb von 48 Stunden ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der Experimente sprechen somit für eine differenzierte proinflammatorische Reaktion der retinalen

Mikroglia ohne eine akute Neurotoxizität auf das emulgierte Silikonöl. Damit konnte klar eine Interaktion der retinalen Mikroglia mit emulgierten Silikonöl nachgewiesen werden. Um die Rolle dieser Interaktion mit Hinblick auf die auftretenden Sehverluste besser beurteilen zu können, ist eine weitere Untersuchung die Fragestellung dieser Arbeit über ein längeres Intervall nötig. Die irreversiblen Sehverluste treten erst nach Wochen der Therapie mit einer Silikonöltamponade auf, sodass die Entwicklung einer neurotoxischen Reaktion durch die chronische Interaktion der retinalen Mikroglia mit dem emulgierten Silikonöl ausgeschlossen werden muss. Die vorliegende Arbeit konnte erste Grundlagen einer Interaktion und Veränderungen der retinalen Mikroglia durch emulgiertes Silikonöl nachweisen und betont somit die Wichtigkeit der weiteren Erforschung der Fragenstellung, um einen eventuellen Pathomechanismus der irreversiblen Sehverluste verstehen zu können.

## **6. Literaturverzeichnis**

- Antoun, J./Azar, G./Jabbour, E./Kourie, H. R./Slim, E./Schakal, A./Jalkh, A. (2016). Vitreoretinal surgery with silicone oil tamponade in primary uncomplicated rhegmatogenous retinal detachment: clinical outcomes and complications. *Retina* (Philadelphia, Pa.) 36 (10), 1906–1912.  
<https://doi.org/10.1097/IAE.0000000000001008>.
- Asaria, R. H. Y./Kon, C. H./Bunce, C./Sethi, C. S./Limb, G. A./Khaw, P. T./Aylward, G. W./Charteris, D. G. (2004). Silicone oil concentrates fibrogenic growth factors in the retro-oil fluid. *The British journal of ophthalmology* 88 (11), 1439–1442.  
<https://doi.org/10.1136/bjo.2003.040402>.
- Barca, F./Caporossi, T./Rizzo, S. (2014). Silicone oil: different physical proprieties and clinical applications. *BioMed research international* 2014, 502143.  
<https://doi.org/10.1155/2014/502143>.
- Bechrakis, N. E./Dimmer, A. (2018). RHEGMAТОGENE NETZHAUTABLÖSLUNG : Epidemiologie und Risikofaktoren. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 115 (2), 163–178. <https://doi.org/10.1007/s00347-017-0647-z>.
- Behrendt, P./Arnold, P./Brueck, M./Rickert, U./Lucius, R./Hartmann, S./Klotz, C. (2016). A helminth protease inhibitor modulates the lipopolysaccharide-induced proinflammatory phenotype of microglia in vitro. *Neuroimmunomodulation* 23 (2), 109–121.  
<https://doi.org/10.1159/000444756>.
- Betis, F./Leguay, J. M./Gastaud, P./Hofman, P. (2003). Multinucleated giant cells in periretinal silicone granulomas are associated with progressive proliferative vitreoretinopathy. *European journal of ophthalmology* 13 (7), 634–641.  
<https://doi.org/10.1177/112067210301300707>.
- Block, M. L./Hong, J. S. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Progress in neurobiology* 76 (2), 77–98.  
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.06.004>.
- Boche, D./Perry, V. H./Nicoll, J. A. R. (2013). Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathology and applied neurobiology* 39 (1), 3–18. <https://doi.org/10.1111/nan.12011>.
- Brown, G. C. (2019). The endotoxin hypothesis of neurodegeneration. *Journal of neuroinflammation* 16 (1), 180. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1564-7>.
- Budde, M./Cursiefen, C./Holbach, L. M./Naumann, G. O. H. (2001). Silicone oil-associated optic nerve degeneration. *American Journal of Ophthalmology* 131 (3), 392–394.  
[https://doi.org/10.1016/s0002-9394\(00\)00800-x](https://doi.org/10.1016/s0002-9394(00)00800-x).
- Cai, X./Ye, T./Liu, C./Lu, W./Lu, M./Zhang, J./Wang, M./Cao, P. (2011). Luteolin induced G2 phase cell cycle arrest and apoptosis on non-small cell lung cancer cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 25 (7), 1385–1391. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.05.009>.
- Caramoy, A./Hagedorn, N./Fauser, S./Kugler, W./Gross, T./Kirchhof, B. (2011). Development of emulsification-resistant silicone oils: can we go beyond 2000 mPas silicone oil? *Investigative ophthalmology & visual science* 52 (8), 5432–5436.  
<https://doi.org/10.1167/iovs.11-7250>.
- Caramoy, A./Schröder, S./Fauser, S./Kirchhof, B. (2009). In vitro emulsification assessment of new silicone oils. *The British journal of ophthalmology* 94 (4), 509–512.  
<https://doi.org/10.1136/bjo.2009.170852>.

- Cazabon, S./Groenewald, C./Pearce, I. A./Wong, D. (2005). Visual loss following removal of intraocular silicone oil. *The British journal of ophthalmology* 89 (7), 799–802. <https://doi.org/10.1136/bjo.2004.053561>.
- Chan, Y. K., Ng, C. O., Knox, P. C., Garvey, M. J., Williams, R. L., Wong, D. (2011). Emulsification of silicone oil and eye movements 52 (13), 9721–9727. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-8586>.
- Chan, Y. K./Cheung, N./Wong, D. (2014). Factors influencing the shear rate acting on silicone oil to cause silicone oil emulsification. *Investigative ophthalmology & visual science* 55 (11), 7451–7456. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-14572>.
- Chan, Y. K./Czanner, G./Shum, H. C./Williams, R. L./Cheung, N./Wong, D. (2017). Towards better characterization and quantification of emulsification of silicone oil in vitro. *Acta ophthalmologica* 95 (5), e385-e392. <https://doi.org/10.1111/aos.13258>.
- Chen, M./Xu, H. (2015). Parainflammation, chronic inflammation, and age-related macular degeneration. *Journal of leukocyte biology* 98 (5), 713–725. <https://doi.org/10.1189/jlb.3RI0615-239R>.
- Cherry, J. D./Olschowka, J. A./O'Banion, M. K. (2014). Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *Journal of neuroinflammation* 11, 98. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-98>.
- Christensen, U. C./La Cour, M. (2012). Visual loss after use of intraocular silicone oil associated with thinning of inner retinal layers. *Acta ophthalmologica* 90 (8), 733–737. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2011.02248.x>.
- Chucair-Elliott, A. J./Conrady, C./Zheng, M./Kroll, C. M./Lane, T. E./Carr, D. J. J. (2014). Microglia-induced IL-6 protects against neuronal loss following HSV-1 infection of neural progenitor cells. *Glia* 62 (9), 1418–1434. <https://doi.org/10.1002/glia.22689>.
- Cibis, P. A./Becker, B./Okun, E, Canaan, S. (1962). The use of liquid silicone in retinal detachment surgery. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 68, 590–599. <https://doi.org/10.1001/archopht.1962.00960030594005>.
- Combrinck, M. I./Perry, V. H./Cunningham, C. (2002). Peripheral infection evokes exaggerated sickness behaviour in pre-clinical murine prion disease. *Neuroscience* 112 (1), 7–11. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00030-1](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00030-1).
- Constable, I./Mohamed, S./Tan, P. L. (1982). Super viscous silicone liquid in retinal surgery. *Australian journal of ophthalmology* 10 (1), 5–11.
- Cox, K. L./Devanarayan, V./Kriauciunas, A./Manetta, J./Montrose, C./Sittampalam, S. (2004). Assay Guidance Manual. Immunoassay Methods. Hg. von G. S. Sittampalam/A. Grossman/K. Brimacombe et al. Bethesda (MD).
- Cross, A. K./Woodroffe, M. N. (1999). Chemokines induce migration and changes in actin polymerization in adult rat brain microglia and a human fetal microglial cell line in vitro. *Journal of Neuroscience Research* 55 (1), 17–23. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19990101\)55:1<17::AID-JNR3>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19990101)55:1<17::AID-JNR3>3.0.CO;2-J).
- Cunningham, Colm/Wilcockson, David C./Campion, Suzanne/Lunnon, Katie/Perry, V. Hugh (2005). Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25 (40), 9275–9284. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2614-05.2005>.
- Da Cunha, A. P./Zhang, Q./Prentiss, M./Wu, X. Q./Kainz, V./Xu, Y. Y./Vrouvlianis, J./Li, H./Rangaswamy, N./Leehy, B./McGee, T. L./Bell, C. L./Bigelow, C. E./Kansara, V./Medley, Q./Huang, Q./Wu, H. Y. (2018). The hierarchy of proinflammatory

- cytokines in ocular inflammation. *Current eye research* 43 (4), Nr. 553–565.  
<https://doi.org/10.1080/02713683.2017.1410180>.
- Das, K. P./Freudenrich, T. M./Mundy, W. R. (2004). Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures. *Neurotoxicology and teratology* 26 (3), Nr. 397–406.  
<https://doi.org/10.1016/j.ntt.2004.02.006>.
- Dogramaci, M./Williams, K./Lee, E./Williamson, T. H. (2013). Foveal light exposure is increased at the time of removal of silicone oil with the potential for phototoxicity. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 251 (1), 35–39.  
<https://doi.org/10.1007/s00417-012-2033-5>.
- Donaldson, J. G. (2015). Immunofluorescence Staining. *Current protocols in cell biology* 69, 4.3.1-7. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0403s69>.
- Echevarria, F. D./Formichella, C. R./Sappington, R. M. (2017). Interleukin-6 deficiency attenuates retinal ganglion cell axonopathy and glaucoma-related vision loss. *Frontiers in neuroscience* 11, 318. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00318>.
- Eckardt, C./Nicolai, U./Czank, M./Schmidt, D. (1993). Okulare Gewebe nach intravitrealer Silikonölinjektion. Histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 90 (3), 250–257.
- Eckle, D./Kampik, A./Hintschich, C./Haritoglou, C./Tonn, J-C/Uhl, E./Lienemann, A. (2005). Visual field defect in association with chiasmal migration of intraocular silicone oil. *The British journal of ophthalmology* 89 (7), 918–920.  
<https://doi.org/10.1136/bjo.2004.062893>.
- Fang, X.-X./Jiang, X.-L./Han, X.-H./Peng, Y.-P./Qiu, Y.-H. (2013). Neuroprotection of interleukin-6 against NMDA-induced neurotoxicity is mediated by JAK/STAT3, MAPK/ERK, and PI3K/AKT signaling pathways. *Cellular and molecular neurobiology* 33 (2), 241–251. <https://doi.org/10.1007/s10571-012-9891-6>.
- Federman, J. L./Schubert, H. D. (1988). Complications associated with the use of silicone oil in 150 eyes after retina-vitreous surgery. *Ophthalmology* 95 (7), 870–876.  
[https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(88\)33080-0](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(88)33080-0).
- Feltgen, N./Walter, P. (2014). Rhegmatogenous retinal detachment--an ophthalmologic emergency. *Deutsches Arzteblatt international* 111 (1-2), 12-21; quiz 22.  
<https://doi.org/10.3238/arztebl.2014.0012>.
- Fisher, Jasmin/Mizrahi, Tal/Schori, Hadas/Yoles, Eti/Levkovitch-Verbin, Hanna/Haggiag, Shalom/Revel, Michel/Schwartz, Michal (2001). Increased post-traumatic survival of neurons in IL-6-knockout mice on a background of EAE susceptibility. *Journal of neuroimmunology* 119 (1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(01\)00342-3](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(01)00342-3).
- Forrester, J. V./Xu, H. (2012). Good news-bad news: the yin and yang of immune privilege in the eye. *Frontiers in immunology* 3, 338. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00338>.
- Gao, H.-M./Hong, J.-S./Zhang, W./Liu, B. (2002a). Distinct role for microglia in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22 (3), 782–790.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-03-00782.2002>.
- Gao, H.-M./Jiang, J./Wilson, B./Zhang, W./Hong, J.-S./Liu, B. (2002b). Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons:

- relevance to Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 81 (6), 1285–1297. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00928.x>.
- Garner, K. M./Amin, R./Johnson, R. W./Scarlett, E. J./Burton, M. D. (2018). Microglia priming by interleukin-6 signaling is enhanced in aged mice. *Journal of neuroimmunology* 324, 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.09.002>.
- Ghazi, N. G./Green, W. R. (2002). Pathology and pathogenesis of retinal detachment. *Eye* (London, England) 16 (4), 411–421. <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6700197>.
- Graeber, M. B./Streit, W. J. (2010). Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathologica* 119 (1), 89–105. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0622-0>.
- Greene, L. A. (1978). Nerve growth factor prevents the death and stimulates the neuronal differentiation of clonal PC12 pheochromocytoma cells in serum-free medium. *The Journal of cell biology* 78 (3), 747–755. <https://doi.org/10.1083/jcb.78.3.747>.
- Greene, L. A./Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (7), 2424–2428. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.7.2424>.
- Grehn, F. (2012). Augenheilkunde. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.
- Grzybowski, A./Pieczynski, J./Ascaso, F. J. (2014). Neuronal complications of intravitreal silicone oil: an updated review. *Acta ophthalmologica* 92 (3), 201–204. <https://doi.org/10.1111/aos.12212>.
- Ha, H./Debnath, B./Neamati, N. (2017). Role of the CXCL8-CXCR1/2 axis in cancer and inflammatory diseases. *Theranostics* 7 (6), 1543–1588. <https://doi.org/10.7150/thno.15625>.
- Hanisch, U.-K./Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature neuroscience* 10 (11), 1387–1394. <https://doi.org/10.1038/nn1997>.
- Heimke, Marvin (2018). Antiinflammatorische Wirkung von Honokiol auf Mikroglia und Astrozyten. Dissertation. Kiel, Christian-Albrechts-Universität. Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:gbv:8-diss-243980>.
- Heinrich, P. C./Behrmann, I./Haan, S./Hermanns, H. M./Müller-Newen, G./Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal* 374 (Pt 1), 1–20. <https://doi.org/10.1042/BJ20030407>.
- Herbert, E. N./Habib, M./Steel, D./Williamson, T. H. (2006). Central scotoma associated with intraocular silicone oil tamponade develops before oil removal. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 244 (2), 248–252. <https://doi.org/10.1007/s00417-005-0076-6>.
- Horn, F./Armbruster, M./Dospil, A. (2009). Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium. 4. Aufl. Stuttgart, Thieme.
- Hornik, T. C./Neniskyte, U./Brown, G. C. (2014). Inflammation induces multinucleation of microglia via PKC inhibition of cytokinesis, generating highly phagocytic multinucleated giant cells. *Journal of neurochemistry* 128 (5), 650–661. <https://doi.org/10.1111/jnc.12477>.
- Ichhpujani, P./Jindal, A./Jay Katz, L. (2009). Silicone oil induced glaucoma: a review. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 247 (12), 1585–1593. <https://doi.org/10.1007/s00417-009-1155-x>.

- Inoue, M./Iriyama, A./Kadonosono, K./Tamaki, Y./Yanagi, Y. (2009). Effects of perfluorocarbon liquids and silicone oil on human retinal pigment epithelial cells and retinal ganglion cells. *Retina (Philadelphia, Pa.)* 29 (5), 677–681. <https://doi.org/10.1097/IAE.0b013e318196fca1>.
- Issa, R./Xia, T./Zarbin, M. A./Bhagat, N. (2019). Silicone oil removal: post-operative complications. *Eye (London, England)*. <https://doi.org/10.1038/s41433-019-0551-7>.
- Jabbour, E./Azar, G./Antoun, J./Kourie, H. R./Abdelmassih, Y./Jalkh, A. (2018). Incidence and risk factors of ocular hypertension following pars plana vitrectomy and silicone oil injection. *Ophthalmologica. Journal international d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift fur Augenheilkunde* 240 (3), 129–134. <https://doi.org/10.1159/000489792>.
- Karkhur, S./Hasanreisoglu, M./Vigil, E./Halim, M. S./Hassan, M./Plaza, C./Nguyen, N. V./Afridi, R./Tran, A. T./Do, D. V./Sepah, Y. J./Nguyen, Q. D. (2019). Interleukin-6 inhibition in the management of non-infectious uveitis and beyond. *Journal of ophthalmic inflammation and infection* 9 (1), 17. <https://doi.org/10.1186/s12348-019-0182-y>.
- Karlstetter, M./Ebert, S./Langmann, T. (2010). Microglia in the healthy and degenerating retina: insights from novel mouse models. *Immunobiology* 215 (9-10), 685–691. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.05.010>.
- Karlstetter, M./Scholz, R./Rutar, M./Wong, W. T./Provis, J. M./Langmann, T. (2015). Retinal microglia: just bystander or target for therapy? *Progress in retinal and eye research* 45, 30–57. <https://doi.org/10.1016/j.preteyes.2014.11.004>.
- Kaur, G./Dufour, J. M. (2012). Cell lines: valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis* 2 (1), 1–5. <https://doi.org/10.4161/spmg.19885>.
- Kitaoka, Y./Kwong, J. M. K./Ross-Cisneros, F. N./Wang, J./Tsai, R. K./Sadun, A. A./Lam, T. T. (2006). TNF-alpha-induced optic nerve degeneration and nuclear factor-kappaB p65. *Investigative ophthalmology & visual science* 47 (4), 1448–1457. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-0299>.
- Klettner, A./Hamann, T./Schlüter, K./Lucius, R./Roider, J (2014). Retinal pigment epithelium cells alter the pro-inflammatory response of retinal microglia to TLR-3 stimulation. *Acta ophthalmologica* 92 (8), e621-9. <https://doi.org/10.1111/aos.12472>.
- Klettner, A./Harms, A./Waetzig, V./Tode, J./Purtakhvanidze, K./Roider, J (2020). Emulsified silicone oil is taken up by and induces pro-inflammatory response in primary retinal microglia. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 258 (9), 1965–1974. <https://doi.org/10.1007/s00417-020-04763-z>.
- Kociok, Norbert/Gavranic, Claudia/Kirchhof, Bernd/Joussen, Antonia M. (2005). Influence on membrane-mediated cell activation by vesicles of silicone oil or perfluorohexyl octane. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 243 (4), 345–358. <https://doi.org/10.1007/s00417-004-1039-z>.
- Langmann, T. (2007). Microglia activation in retinal degeneration. *Journal of leukocyte biology* 81 (6), 1345–1351. <https://doi.org/10.1189/jlb.0207114>.
- Leibinger, M./Müller, A./Gobrecht, P./Diekmann, H./Andreadaki, A./Fischer, D. (2013). Interleukin-6 contributes to CNS axon regeneration upon inflammatory stimulation. *Cell death & disease* 4, e609. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.126>.

- Leung, K. W./Barnstable, C. J./Tombran-Tink, J. (2009). Bacterial endotoxin activates retinal pigment epithelial cells and induces their degeneration through IL-6 and IL-8 autocrine signaling. *Molecular immunology* 46 (7), 1374–1386.  
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.12.001>.
- Li, L./Eter, N./Heiduschka, P. (2015). The microglia in healthy and diseased retina. *Experimental eye research* 136, 116–130. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.04.020>.
- Liaqat, U./Ko, H./Suh, H./Lee, M./Pyun, J.-C. (2017). UV-irradiated parylene surfaces for proliferation and differentiation of PC-12 cells. *Enzyme and microbial technology* 97, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.10.016>.
- Light, D. J. (2006). Silicone oil emulsification in the anterior chamber after vitreoretinal surgery. *Optometry (St. Louis, Mo.)* 77 (9), 446–449.  
<https://doi.org/10.1016/j.optm.2006.04.119>.
- Liu, Z/Fu, G/Liu, A (2017). The relationship between inflammatory mediator expression in the aqueous humor and secondary glaucoma incidence after silicone oil tamponade. *Experimental and therapeutic medicine* 14 (6), 5833–5836.
- Loose, K. S./Herdegen, T. (2012). c Jun N terminale Kinasen vermitteln Fas induzierte Neuritenregeneration in PC12 Zellen. Med. Diss., Kiel. Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:gbv:8-diss-94149>.
- Loose, Katja Susanne/Herdegen, Thomas. c Jun N terminale Kinasen vermitteln Fas induzierte Neuritenregeneration in PC12 Zellen. Kiel, Univ., Diss., 2012. Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:gbv:8-diss-94149>.
- Los Rios, C./Cano-Abad, M. F./Villarroya, M./López, M. G. (2018). Chromaffin cells as a model to evaluate mechanisms of cell death and neuroprotective compounds. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 470 (1), 187–198.  
<https://doi.org/10.1007/s00424-017-2044-5>.
- Lucke, K. H./Foerster, M. H./Laqua, H. (1987). Long-term results of vitrectomy and silicone oil in 500 cases of complicated retinal detachments. *American Journal of Ophthalmology* 104 (6), 624–633. [https://doi.org/10.1016/0002-9394\(87\)90176-0](https://doi.org/10.1016/0002-9394(87)90176-0).
- Lull, M. E./Block, Michelle L. (2010). Microglial activation and chronic neurodegeneration. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 7 (4), 354–365. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.05.014>.
- Lüllmann-Rauch, R. (2015). Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Ma, X. C./Gottschall, P. E./Chen, L. T./Wiranowska, M./Phelps, C. P. (2002). Role and mechanisms of interleukin-1 in the modulation of neurotoxicity. *Neuroimmunomodulation* 10 (4), 199–207. <https://doi.org/10.1159/000068322>.
- Madeira, M. H./Boia, R./Santos, P. F./Ambrósio, A. F./Santiago, A. R. (2015). Contribution of microglia-mediated neuroinflammation to retinal degenerative diseases. *Mediators of inflammation* 2015, 673090. <https://doi.org/10.1155/2015/673090>.
- Miller, J. B./Papakostas, T. D./Vavvas, D. G. (2014). Complications of emulsified silicone oil after retinal detachment repair. *Seminars in Ophthalmology* 29 (5-6), 312–318.  
<https://doi.org/10.3109/08820538.2014.962181>.
- Morescalchi, F./Costagliola, C./Duse, S./Gambicorti, E./Parolini, B./Arcidiacono, B./Romano, M. R./Semeraro, F. (2014). Heavy silicone oil and intraocular inflammation. *BioMed research international* 2014, 574825. <https://doi.org/10.1155/2014/574825>.
- Morgan, D. M. (1998). Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 79, 179–183. <https://doi.org/10.1385/0-89603-448-8:179>.

- Mosmann, T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65 (1-2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- Moya, R./Chandra, A./Banerjee, P. J./Tsouris, D./Ahmad, N./Charteris, D. G. (2015). The incidence of unexplained visual loss following removal of silicone oil. *Eye* (London, England) 29 (11), 1477–1482. <https://doi.org/10.1038/eye.2015.135>.
- Mrejen, S./Sato, T./Fisher, Y./Spaide, R. F. (2014). Intraretinal and intra-optic nerve head silicone oil vacuoles using adaptive optics. *Ophthalmic surgery, lasers & imaging retina* 45 (1), 71–73. <https://doi.org/10.3928/23258160-20131220-11>.
- Nakamura, K./Refojo, M. F./Crabtree, D. V. (1990). Factors contributing to the emulsification of intraocular silicone and fluorosilicone oils. *Investigative ophthalmology & visual science* 31 (4), 647–656.
- Nakamura, Yoichi (2002). Regulating factors for microglial activation. *Biological & pharmaceutical bulletin* 25 (8), 945–953. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.945>.
- Narayan, Daniel S./Casson, Robert J./Ebneter, Andreas/Chidlow, Glyn/Grace, Peter M./Hutchinson, Mark R./Wood, John Pm (2014). Immune priming and experimental glaucoma: the effect of prior systemic lipopolysaccharide challenge on tissue outcomes after optic nerve injury. *Clinical & experimental ophthalmology* 42 (6), 539–554. <https://doi.org/10.1111/ceo.12289>.
- Natoli, R./Fernando, N./Madigan, M./Chu-Tan, J. A./Valter, K./Provis, J./Rutar, M. (2017). Microglia-derived IL-1 $\beta$  promotes chemokine expression by Müller cells and RPE in focal retinal degeneration. *Molecular neurodegeneration* 12 (1), 31. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0175-y>.
- Nimmerjahn, A./Kirchhoff, F./Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* (New York, N.Y.) 308 (5726), 1314–1318. <https://doi.org/10.1126/science.1110647>.
- Ober, R. R./Blanks, J. C./Ogden, T. E./Pickford, M./Minckler, D. S./Ryan, S. J. (1983). Experimental retinal tolerance to liquid silicone. *Retina* (Philadelphia, Pa.) 3 (2), 77–85. <https://doi.org/10.1097/00006982-198300320-00002>.
- Odrobina, D./Laudańska-Olszewska, I. (2014). Analysis of the time and location of the silicone oil emulsification by spectral-domain optical coherence tomography after silicone oil tamponade. *BioMed research international* 2014, 372045. <https://doi.org/10.1155/2014/372045>.
- Ohsawa, K./Imai, Y./Sasaki, Y./Kohsaka, S. (2004). Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *Journal of neurochemistry* 88 (4), 844–856. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02213.x>.
- Papp, A./Tóth, J./Kerényi, T./Jäckel, M./Süveges, I. (2004). Silicone oil in the subarachnoidal space--a possible route to the brain? *Pathology, research and practice* 200 (3), 247–252. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2004.01.001>.
- Perry, V. H./Holmes, C. (2014). Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nature reviews. Neurology* 10 (4), 217–224. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.38>.
- Peskin, A. V./Winterbourn, C. C. (2017). Assay of superoxide dismutase activity in a plate assay using WST-1. *Free radical biology & medicine* 103, 188–191. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.033>.
- Pleyer, U./Pohlmann, D. (2017). Anatomie und Immunologie des Auges. *Zeitschrift für Rheumatologie* 76 (8), 656–663. <https://doi.org/10.1007/s00393-017-0344-y>.

- Radio, N. M./Freudenrich, T. M./Robinette, B. L./Crofton, K. M./Mundy, W. R. (2010). Comparison of PC12 and cerebellar granule cell cultures for evaluating neurite outgrowth using high content analysis. *Neurotoxicology and teratology* 32 (1), 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2009.06.003>.
- Radio, N M./Mundy, W R. (2008). Developmental neurotoxicity testing in vitro: models for assessing chemical effects on neurite outgrowth. *Neurotoxicology* 29 (3), 361–376. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2008.02.011>.
- Rashid, Khalid/Akhtar-Schaefer, Isha/Langmann, Thomas (2019). Microglia in Retinal Degeneration. *Frontiers in immunology* 10, 1975. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01975>.
- Ren, K./Torres, R. (2009). Role of interleukin-1beta during pain and inflammation. *Brain research reviews* 60 (1), 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.12.020>.
- Riss, T./Niles, A./Moravec, R./Karassina, N./Vidugiriene, J. (2004). Assay Guidance Manual. Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells. Hg. von G. Sitta Sittampalam/Abigail Grossman/Kyle Brimacombe et al. Bethesda (MD).
- Roca, J. A./Wu, L./Berrocal, M./Rodriguez, F./Alezzandrini, A./Alvira, G./Velez-Montoya, R./Quiroz-Mercado, H./Fernando Arevalo, J./Serrano, M./Lima, L. H./Figueroa, M./Farah, M./Chico, G. (2017). Un-explained visual loss following silicone oil removal: results of the Pan American Collaborative Retina Study (PACORES) Group. *International journal of retina and vitreous* 3, 26. <https://doi.org/10.1186/s40942-017-0079-6>.
- Roider, J. (2016). Visual loss under Silicon oil (2016) VAIL- Vitrectomy Feb. 20-23:15.
- Rossi, S./Motta, C./Studer, V./Macchiarulo, G./Volpe, E./Barbieri, F./Ruocco, G./Buttari, F./Finardi, A./Mancino, R./Weiss, S./Battistini, L./Martino, G./Furlan, R./Drulovic, J./Centonze, D. (2014a). Interleukin-1 $\beta$  causes excitotoxic neurodegeneration and multiple sclerosis disease progression by activating the apoptotic protein p53. *Molecular neurodegeneration* 9, 56. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-56>.
- Rossi, S./Motta, C./Studer, V./Rocchi, C./Macchiarulo, G./Barbieri, F./Marfia, G./Furlan, R./Martino, G./Mancino, R./Centonze, D. (2014b). Interleukin-8 is associated with acute and persistent dysfunction after optic neuritis. *Multiple sclerosis* (Hounds mills, Basingstoke, England) 20 (14), 1841–1850. <https://doi.org/10.1177/1352458514537365>.
- Rothaug, M./Becker-Pauly, C./Rose-John, S. (2016). The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *Biochimica et biophysica acta* 1863 (6 Pt A), 1218–1227. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.03.018>.
- Rudkin, B. B./Lazarovici, P./Levi, B. Z./Abe, Y./Fujita, K./Guroff, G. (1989). Cell cycle-specific action of nerve growth factor in PC12 cells: differentiation without proliferation. *The EMBO Journal* 8 (11), 3319–3325.
- Russo, A./Morescalchi, F./Donati, S./Gambicorti, E./Azzolini, C./Costagliola, C./Semeraro, F. (2018). Heavy and standard silicone oil: intraocular inflammation. *International ophthalmology* 38 (2), 855–867. <https://doi.org/10.1007/s10792-017-0489-3>.
- Sachsenweger, M./Klauß, V. (2003). *Augenheilkunde*. 2. Aufl. Stuttgart, Thieme.
- Sappington, R. M./Chan, M./Calkins, D. J. (2006). Interleukin-6 protects retinal ganglion cells from pressure-induced death. *Investigative ophthalmology & visual science* 47 (7), 2932–2942. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-1407>.
- Savion, N./Alhalel, A./Treister, G./Bartov, E. (1996). Role of blood components in ocular silicone oil emulsification. Studies on an in vitro model. *Investigative ophthalmology & visual science* 37 (13), 2694–2699.

- Scheerlinck, L. M./Schellekens, P. A./Liem, A. T./Steijns, D./van Leeuwen, R. (2016). Incidence, risk factors, and clinical characteristics of unexplained visual loss after intraocular silicone oil for macula-on retinal detachment. *Retina* (Philadelphia, Pa.) 36 (2), 342–350. <https://doi.org/10.1097/IAE.0000000000000711>.
- Scheller, J./Chalaris, A./Schmidt-Arras, D./Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et biophysica acta* 1813 (5), 878–888. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.034>.
- Schurmans, A./van Calster, J./Stalmans, P. (2009). Macular hole surgery with inner limiting membrane peeling, endodrainage, and heavy silicone oil tamponade. *American Journal of Ophthalmology* 147 (3), 495–500. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2008.09.003>.
- Schwartz, S. G./Flynn, H. W./Lee, W.-H./Wang, X. (2014). Tamponade in surgery for retinal detachment associated with proliferative vitreoretinopathy. *The Cochrane database of systematic reviews* (2), CD006126. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006126.pub3>.
- Semple, B. D./Kossmann, T./Morganti-Kossmann, M. C. (2010). Role of chemokines in CNS health and pathology: a focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 networks. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 30 (3), 459–473. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.240>.
- Senra, H./Barbosa, F./Ferreira, P./Vieira, C. R./Perrin, P. B./Rogers, H./Rivera, D./Leal, I. (2015). Psychologic adjustment to irreversible vision loss in adults. *Ophthalmology* 122 (4), 851–861. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2014.10.022>.
- Seow, S. L. S./Hong, S. L./Lee, G. S./Malek, S. N. A./Sabaratnam, V. (2017). 6-shogaol, a neuroactive compound of ginger (jahe gajah) induced neuritogenic activity via NGF responsive pathways in PC-12 cells. *BMC complementary and alternative medicine* 17 (1), 334. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1837-6>.
- Shen, Y.-D./Yang, C.-M. (2007). Extended silicone oil tamponade in primary vitrectomy for complex retinal detachment in proliferative diabetic retinopathy: a long-term follow-up study. *European journal of ophthalmology* 17 (6), 954–960.
- Shimizu, H./Kaneko, H./Suzumura, A./Takayama, K./Namba, R./Funahashi, Y./Kataoka, K./Iwase, T. Hwang, S.-J./Ito, S./Yamada, K./Ueno, S./Ito, Y./Terasaki, H. (2019). Biological characteristics of subsilicone oil fluid and differences with other ocular humors. *Translational vision science & technology* 8 (1), 28. <https://doi.org/10.1167/tvst.8.1.28>.
- Silverman, S. M./Wong, W. T. (2018). Microglia in the retina: roles in development, maturity, and disease. *Annual review of vision science* 4, 45–77. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-091517-034425>.
- Spittau, B./Zhou, X./Ming, M./Kriegstein, K. (2012). IL6 protects MN9D cells and midbrain dopaminergic neurons from MPP+-induced neurodegeneration. *Neuromolecular medicine* 14 (4), 317–327. <https://doi.org/10.1007/s12017-012-8189-7>.
- Stankov, A./Belakaposka-Srpanova, V./Bitoljanu, N./Cakar, L./Cakar, Z./Rosoklija, G. (2015). Visualisation of microglia with the use of immunohistochemical double staining method for CD-68 and Iba-1 of cerebral tissue samples in cases of brain contusions. *Prilozi (Makedonska akademija na naukite i umetnostite. Oddelenie za medicinski nauki)* 36 (2), 141–145. <https://doi.org/10.1515/prilozi-2015-0062>.
- Steel, D. (2014). Retinal detachment. *BMJ clinical evidence* 2014.

- Streilein, J. W. (2003). Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nature reviews. Immunology* 3 (11), 879–889. <https://doi.org/10.1038/nri1224>.
- Streit, W. J. (2002). Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40 (2), 133–139. <https://doi.org/10.1002/glia.10154>.
- Szurman, Peter/Roters, Sigrid/Grisanti, Salvatore/Aisenbrey, Sabine/Rohrbach, Jens M./Warga, Max/Gelisken, Faik/Spitzer, Martin S./Bartz-Schmidt, Karl U. (2007). Primary silicone oil tamponade in the management of severe intraocular foreign body injuries: an 8-year follow-up. *Retina (Philadelphia, Pa.)* 27 (3), 304–311. <https://doi.org/10.1097/01iae.0000237685.99713.83>.
- Thirumangalakudi, L./Yin, L./Rao, H. V./Grammas, P. (2007). IL-8 induces expression of matrix metalloproteinases, cell cycle and pro-apoptotic proteins, and cell death in cultured neurons. *Journal of Alzheimer's Disease* 11 (3), 305–311. <https://doi.org/10.3233/JAD-2007-11307>.
- Tischler, A. S. (2002). Chromaffin cells as models of endocrine cells and neurons. *Annals of the New York Academy of Sciences* 971, 366–370. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04498.x>.
- Tode, J./Purtskhvanidze, K./Oppermann, T./Hillenkamp, J./Treumer, F./Roider, J. (2016). Vision loss under silicone oil tamponade. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 254 (8), 1465–1471. <https://doi.org/10.1007/s00417-016-3405-z>.
- Town, T./Jeng, D./Alexopoulou, L./Tan, J./Flavell, R. A. (2006). Microglia recognize double-stranded RNA via TLR3. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 176 (6), 3804–3812. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.6.3804>.
- Umegaki, H./Yamada, K./Naito, M./Kameyama, T./Iguchi, A./Nabeshima, T. (1996). Protective effect of interleukin-6 against the death of PC12 cells caused by serum deprivation or by the addition of a calcium ionophore. *Biochemical pharmacology* 52 (6), 911–916. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(96\)00422-4](https://doi.org/10.1016/0006-2952(96)00422-4).
- Waetzig, V./Herdegen, T. (2005). MEKK1 controls neurite regrowth after experimental injury by balancing ERK1/2 and JNK2 signaling. *Molecular and cellular neurosciences* 30 (1), 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.06.001>.
- Waetzig, V./Loose, K./Haeusgen, W./Herdegen, T. (2008). c-Jun N-terminal kinases mediate Fas-induced neurite regeneration in PC12 cells. *Biochemical pharmacology* 76 (11), 1476–1484. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.07.014>.
- Waetzig, V./Riffert, J./Cordt, J./Reinecke, K./Haeusgen, W./Boehm, R./Cascorbi, I./Herdegen, T. (2017). Neurodegenerative effects of azithromycin in differentiated PC12 cells. *European journal of pharmacology* 809, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.05.002>.
- Wang, J.-J./Williams, W./Wang, B./Wei, J./Lu, X./Cheng, J.-W./Gordon, J. R./Li, J.-M./Li, F. (2018). Cytotoxic effect of interleukin-8 in retinal ganglion cells and its possible mechanisms. *International journal of ophthalmology* 11 (8), 1277–1283. <https://doi.org/10.18240/ijo.2018.08.05>.
- Wickham, L. J./Asaria, R. H./Alexander, R./Luthert, P./Charteris, D. G. (2007). Immunopathology of intraocular silicone oil: retina and epiretinal membranes. *The British journal of ophthalmology* 91 (2), 258–262. <https://doi.org/10.1136/bjo.2006.103549>.

- Wolf, S. A./Boddeke, H. W. G. M./Kettenmann, H. (2017). Microglia in physiology and disease. *Annual review of physiology* 79, 619–643. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034406>.
- Wooff, Y./Man, S. M./Aggio-Bruce, R./Natoli, R./Fernando, N. (2019). IL-1 family members mediate cell death, inflammation and angiogenesis in retinal degenerative diseases. *Frontiers in immunology* 10, 1618. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01618>.
- Yamamoto, S./Takeuchi, S. (2000). Silicone oil and fluorosilicone. *Seminars in Ophthalmology* 15 (1), 15–24. <https://doi.org/10.3109/08820530009037847>.
- Ye, L./Huang, Y./Zhao, L./Li, Y./Sun, L./Zhou, Y./Qian, G./Zheng, J. C. (2013). IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  induce neurotoxicity through glutamate production: a potential role for neuronal glutaminase. *Journal of neurochemistry* 125 (6), 897–908. <https://doi.org/10.1111/jnc.12263>.
- Zelová, H./Hošek, J. (2013). TNF- $\alpha$  signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 62 (7), 641–651. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0633-0>.
- Zhao, L./Zabel, M. K./Wang, X./Ma, W./Shah, P./Fariss, R. N./Qian, H./Parkhurst, C. N./Gan, W.-B./Wong, W. T. (2015). Microglial phagocytosis of living photoreceptors contributes to inherited retinal degeneration. *EMBO molecular medicine* 7 (9), 1179–1197. <https://doi.org/10.15252/emmm.201505298>.

## **7. Anhang**

### **7.1 Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellkulturen .....	18
Abbildung 2: Herstellungsvorganges einer Silikonöl-Emulsion.....	23
Abbildung 3: Größenbeispiele der Mikroglia und Beispielfotos .....	25
Abbildung 4: Fotoraster zur Auswertung der Einschlüsse .....	26
Abbildung 5: Ergebnisse der Iba-1 Färbung der retinalen Mikroglia.....	30
Abbildung 6: Größenverteilung der Kontrollen der retinalen Mikroglia .....	31
Abbildung 7: Größenverteilung der retinalen Mikroglia nach Inkubation mit Silikonöl.....	33
Abbildung 8: Ergebnisse der Vitalitätstestung MTT-Assay .....	34
Abbildung 9: Ergebnisse der Silikonaufnahme der retinalen Mikroglia.....	35
Abbildung 10: Interleukin 6-Konzentration im ELISA .....	36
Abbildung 11: Interleukin 8-ELISA .....	37
Abbildung 12: Interleukin 1 $\beta$ -ELISA .....	38
Abbildung 13: Tumornekrosefaktor- $\alpha$ - ELISA.....	39
Abbildung 14: Ergebnisse WST-Assay an neuronalen PC12-Zellen .....	40

### **7.2 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben. Mein aufrichtiger Dank gilt zuerst Frau Prof. Dr. Alexa Klettner für die umfassende Unterstützung, die kompetente Betreuung, sowie für die ansteckende Begeisterung für die Thematik. Ich freue mich, dass die gemeinsame Arbeit hiermit einen runden Abschluss findet. Auch bei Herrn Prof. Dr. Roider möchte ich mich ausdrücklich für die Möglichkeit bedanken, die Doktorarbeit an der Klinik für Ophthalmologie absolvieren zu dürfen. Für die finanzielle Unterstützung und dadurch die Ermöglichung eines Forschungsfreisemesters bedanke ich mich bei der Medizinische Fakultät der CAU Kiel für das Promotionsstipendium sehr.

Zusammenfassend habe ich in den letzten Jahren, bei kleineren, alltäglichen bis schweren Problemen (inklusive rätselhafter Zellsterben) in verschiedenen Bereichen stets kompetente Hilfe gefunden. Dafür bedanke ich mich herzlich, u.a bei PD Vicki Waetzig, Dr. med Jan Tode, PD Dr. Konstantine Purtskhvanidze, Serap Luick, Monika Grell, Monika Marquardt, und den anderen Promovierenden und Labormitarbeitern.

Neben der fachlichen Unterstützung bedanke ich mich besonders bei meiner Familie für den seelischen Beistand, Zuversicht und Ermutigung. Gewidmet ist diese Arbeit meinen Großmüttern, Bertha Katharina Hügle und Regina Dorothea Harms.

### **7.3 Lebenslauf**

Dieser Abschnitt ist aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten.

### **7.4 Veröffentlichung**

- |         |  |
|---------|--|
| 06/2020 | Klettner, A., Harms, A., Waetzig, V. et al. Emulsified silicone oil is taken up by and induces pro-inflammatory response in primary retinal microglia. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 258, 1965–1974 (2020). <a href="https://doi.org/10.1007/s00417-020-04763-z">https://doi.org/10.1007/s00417-020-04763-z</a> |
| 09/2019 | Postervorstellung auf dem Kongress der Deutschophthalmologischen Gesellschaft (DOG) in Berlin  |