

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR AUGENHEILKUNDE
PROF. DR. H. HELBIG
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Histopathologische Auswirkungen der Radiodiathermie bei der Penetration der
Aderhaut im Rahmen der Implantation einer subretinalen Sehprothese am
Schweineauge**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Verena Eder

2010

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR AUGENHEILKUNDE
PROF. DR. H. HELBIG
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Histopathologische Auswirkungen der Radiodiathermie bei der Penetration der
Aderhaut im Rahmen der Implantation einer subretinalen Sehprothese am
Schweineauge**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Verena Eder

2010

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter: PD Dr. Helmut Sachs
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Kühnel
Tag der mündlichen Prüfung: 11.10.2010

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 EINFÜHRUNG	4
1.1. Hintergrund: Elektronische Sehprothesen	4
1.2. Implantation eines subretinalen Mikroelektrodenchips	6
1.2.1. Das subretinale Implantat	6
1.2.2. Verschiedene chirurgische Techniken bei der Implantation	8
1.3. Anatomie und Physiologie der Aderhaut	11
1.3.1. Blutversorgung des Auges	11
1.3.2. Anatomie der Choroidea	12
a) Überblick	12
b) Schichten, anatomische und funktionelle Einheiten	14
c) Venöses System	17
1.3.3. Physiologie der Aderhaut	17
1.4. Fragestellung und Ziel dieser Arbeit	18
2 METHODEN	19
2.1. Möglichkeiten der Blutungsverhinderung	19
2.1.1. Verschiedene konventionelle Methoden der Blutstillung	19
2.1.2. Verwendung des Diodenlasers	21
2.2. Radiodiathermie	23
2.2.1. Funktionsprinzip	23
2.2.2. Verschiedene Typen von Radiowellen und deren Anwendung	25
2.2.3. Radiodiathermie im Vergleich mit Skalpell und Laser	28

2.3.	Präparate	29
2.3.1.	Herkunft und Behandlung der histologisch untersuchten Präparate	29
a)	Operationsverfahren	29
b)	Präparation des Gewebes	30
2.3.2.	Übersichtsfärbung mit Hämalaun-Eosin	31
2.3.3.	Apoptose und TUNEL-Test	32
3	ERGEBNISSE	35
3.1.	Histopathologische Untersuchung des mit Hämalaun-Eosin gefärbten Objektes	35
3.1.1.	Überblick	35
3.1.2.	Spezielle Betrachtung der Aderhaut	35
a)	Veränderungen des choroidalen Bindegewebes	36
b)	Veränderungen an den Gefäßen	38
3.1.3.	Weitere Auffälligkeiten	41
3.1.4.	Zusammenfassung	44
3.2.	Auswertung des TUNEL-Tests	44
3.2.1.	Untersuchung der Positivkontrolle	45
3.2.2.	Untersuchung des Test-Präparates	46
3.2.2.	Vergleich und Zusammenfassung des Testergebnisses	47
3.3.	Evaluierung der erforderlichen Geräteparameter	49
3.4.	Vergleichende Betrachtung des mit dem Diodenlaser bearbeiteten Präparates	50
4	DISKUSSION	54
4.1.	Bewertung der Ergebnisse	54
4.1.1.	Histopathologische Bedeutung der Untersuchungsergebnisse des mit	

Hämalaun-Eosion gefärbtes Präparates	54
4.1.2. Bewertung des TUNEL-Test-Ergebnisses	56
4.1.3. Abschließende Betrachtung	56
4.2. Erfolgreiche Anwendung des Radiodiathermie-Verfahrens	58
4.2.1. Subretinale Chip-Implantation nahezu ohne Blutungen	58
4.2.2. Große Erfolge bereits auf Gebieten der okuloplastischen Chirurgie	59
4.3. Ausblick	59
4.3.1. Subretinales Implantat – Zwischenzeitliche Anwendung beim Menschen	59
4.3.2. Weitere Einsatzmöglichkeiten der Radiodiathermie zur unblutigen Aderhaut-Penetration	60
 5 ZUSAMMENFASSUNG	 62
 6 ANHANG	 63
 7 LITERATURVERZEICHNIS	 64
 8 LEBENS LAUF	 67
 9 DANKSAGUNG	 68

1 EINFÜHRUNG

1.1. Hintergrund: Elektrische Sehprothesen

Durch die Fortschritte in der modernen Mikrotechnologie finden elektrische Stimulatoren in der Medizin zum Ersatz motorischer und sensorischer Körperfunktionen immer häufigere Verwendung. Als Beispiele seien der Herzschrittmacher zur Steuerung kardialer Funktionen oder die großen Erfolge bei den sog. Cochlea-Implantaten zum Ersatz des Hörvermögens bei manchen Formen der Taubheit genannt. Gemeinsame Basis aller Versuche, elektrische Stimulatoren zu therapeutischen Zwecken zu verwenden, ist die prinzipielle Möglichkeit, durch ein externes elektrisches Feld die Membraneigenschaften eines Neurons so zu beeinflussen, dass dieses Aktionspotenziale generiert.

Durch die Erfolge der Mikroelektronik ermutigt, wagen sich nun seit vielen Jahren internationale Forschergruppen auch an das Gebiet des Sehsinnes heran und versuchen, dessen komplexere Probleme auf ähnliche Art und Weise zu lösen. So soll bei Blinden oder stark Sehgeschädigten ein rudimentäres Seh- oder Orientierungsvermögen wiederhergestellt werden. Betrachtet man das kompliziert aufgebaute visuelle System mit den einzelnen Stationen der Sehbahn, so bieten sich hier unterschiedliche Ansatzmöglichkeiten für eine elektronische Stimulation von Neuronen des Sehsystems.

Derzeit werden die nachfolgend dargestellten unterschiedlichen Konzepte verfolgt:

Bei der sog. **Kortexprothese** wird über eine direkte Stimulation des visuellen Kortex versucht, eine Seh wahrnehmung auszulösen. Dieser Ansatz ist zwar unabhängig von der Funktionsfähigkeit von Netzhaut und Sehnerv, doch wird diese Vorgehensweise durch die komplexen Verarbeitungs- und Umcodierungsschritte über eine Vielzahl von Interneuronen und die unserer Kenntnis weitgehend entzogenen Reizverarbeitung im Kortex verkompliziert.

Eine Ummantelung des Nervus opticus mit vier Elektroden zur elektrischen Stimulation soll bei der **Sehnervprothese** zur Auslösung von Seh wahrnehmungen führen.

Einen weiteren Ansatzpunkt für die Anbringung elektronischer Stimulatoren stellt das Auge selbst, genauer gesagt die Netzhaut dar. Dabei unterscheidet man zwei prinzipielle Lösungsansätze (vgl. Abb.1.1.): Beim **epiretinalen Implantat** findet eine Stimulusapplikation an der Netzhautoberfläche statt, das **subretinale Implantat** hat seine Wirkung an der Unterseite der Netzhaut. Bedenkt man, dass nahezu die Hälfte aller Erblindungen durch Netzhauterkrankungen verursacht werden, sind Forschungen in diesem Bereich sehr lohnenswert. Erste Ansätze fanden sich bei TASSIKER 1954, doch erst die Fortschritte der Mikroelektronik führen zu einem nachhaltigen Bestreben, elektronische Sehprothesen zu entwickeln.

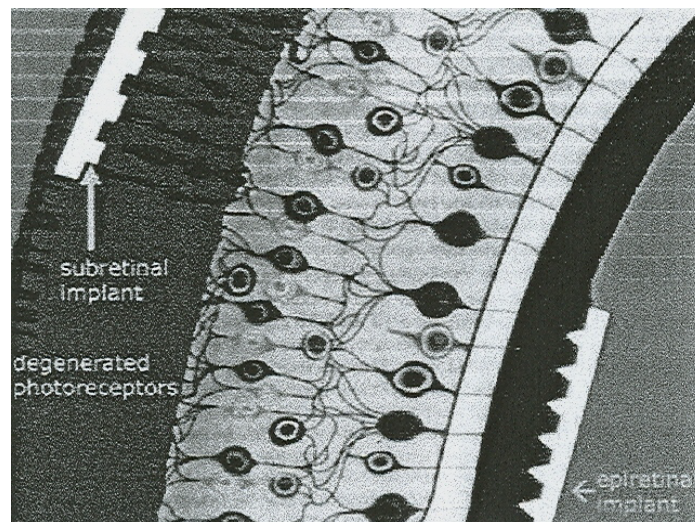


Abb. 1.1.¹ Die zwei prinzipiellen Ansätze der retinalen Stimulation

Das **epiretinale Implantat** besteht aus zwei Komponenten, einem externen und einem implantierten Teil, letzterer, den man auch als Retina-Stimulator bezeichnen kann, liegt als Mikroelektrodenfeld der glaskörperseitigen Oberfläche der inneren Netzhaut an, von wo aus elektrische Impulse direkt auf die Ganglienzellaxone übertragen und über den Nervus opticus ins Gehirn weitergeleitet werden. Über

¹ aus Sachs H. G., Gabel V.-P., Retinal replacement – the development of microelectronic retinal prostheses – experience with subretinal implants and new aspects, Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology

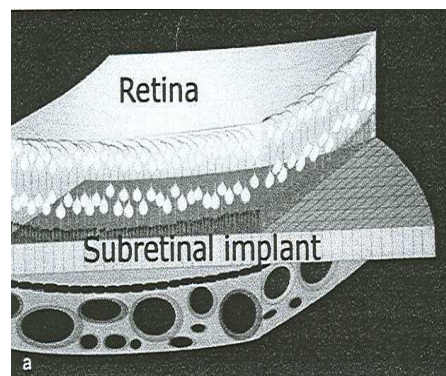
Leiterbahnen ist das Implantat mit dem externen Teil der Prothese verbunden, welcher mehrere Funktionen erbringen muss: eine Kamera als Sensor zur Aufnahme von Bildern aus der Umwelt, ein externer Prozessor, welcher die hier erhaltenen visuellen Informationen in elektrische Impulsfolgen umcodiert, und ein Retina-Encoder, der die retinale Vorverarbeitung der Eingangssignale simuliert und schließlich die Impulse an den im Inneren des Auges liegenden Teil des Implantates weitergibt. Alternativ kann als Verbindung des externen und internen Anteils auch eine drahtlose Übertragung dienen, was die Platzierung eines Signalempfängers im Auge beispielsweise im Bereich der explantierten Linse zur Folge hat.

Im Prinzip ist das implantierte Mikroelektrodenfeld also lediglich eine Kontaktstruktur, die eine vorverarbeitete visuelle Information in das optische System einliest.

1.2. Implantation eines subretinalen Mikroelektrodenchips

1.2.1. Das subretinale Implantat

Auf ganz andere Weise arbeitet das **subretinale Implantat**, welches – wie der Name schon sagt – *unter* der Netzhaut seine Funktion erfüllen soll, genauer gesagt zwischen Pigmentepithel und neuronaler Retina platziert wird. In Deutschland wird dieses Konzept von einem Konsortium (“SUBRET”), dem auch die Universitäts-Augenklinik Regensburg angehört, unter der Koordination der Universität Tübingen intensiv verfolgt, in den USA beschäftigt sich seit Anfang der Neunziger CHOW mit diesem Thema, der auch beim Menschen die ersten subretinalen Implantate eingesetzt hat.



Im Gegensatz zum epiretinalen Konzept besitzt das subretinale Implantat lichtempfindliche Elemente und soll somit einen Ersatz von Photorezeptoren der Netzhaut darstellen.

Der Prototyp eines solchen Implantates sieht folgendermaßen aus (siehe auch Abbildung 1.2.):

Der flexible folienartige Chip besteht aus einem ca. 50-100 μm dünnen Silikonplättchen mit einem Durchmesser von 2-3 mm, auf dem mehrere tausend lichtempfindliche Photodioden aufgebracht sind, jeweils versehen mit einer Mikroelektrode aus Gold oder Titanumnitrit. Die einzelnen Photodioden mit einer Größe von 20 x 20 μm sind in Reihen angeordnet (daher auch die Bezeichnung “Mikrophotodioden-Array”) und sollen als “artifizielle Photorezeptoren” die Funktion der Stäbchen und Zapfen ersetzen:

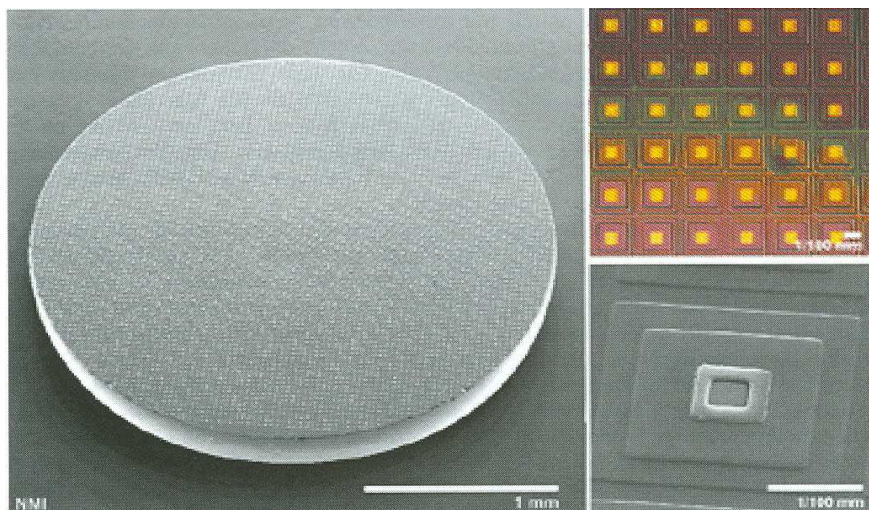


Abb. 1.2.² Prototyp eines subretinalen Chips; rechts: Einzelelektroden, welche die erloschene Photorezeptorfunktion ersetzen sollen

Durch den photovoltaischen Effekt produziert das von außen auf den Chip auffallende Licht elektrischen Strom, der wiederum die Mikroelektroden aktiviert. Diese können dann die sich anschließenden retinalen Neurone (Bipolare, Amakrine und Horizontalzellen) elektrisch stimulieren und zwar genau an dem Ort, an dem die

² aus Sachs H. G., Gabel V.-P., Sehprothesen - Prinzipien und operative Technik, Nova Acta Leopoldina

Elektroden positioniert sind.

Ein bedeutender Unterschied zum epiretinalen Implantat ergibt sich also dadurch, dass der subretinale Chip “nur” funktionslos gewordene Photorezeptoren ersetzt und somit der natürliche Signalübertragungs- und verarbeitungsweg der Netzhaut genutzt werden kann. Zudem bleibt die Topographie der Erregung vollständig erhalten, was einen möglichst natürlichen Seheindruck zur Folge hat. Ebenso lassen sich Augenbewegungen für den Seheindruck nützlich machen.

Selbstverständlich setzt die Verwendung eines solchen Implantates die erhaltene Funktionsfähigkeit der anderen Komponenten des visuellen Systems voraus, sowohl Optik als auch Ganglienzellen und zentrales Sehsystem müssen weitestgehend intakt sein. Genau dies ist der Fall bei Retinitis pigmentosa, eine hereditäre Erkrankung, für die eine Dysfunktion des Pigmentepithels und ein progredienter Verlust der Photorezeptoren charakteristisch ist, während der Großteil der übrigen Netzhautschichten intakt bleibt.

1.2.2. Verschiedene chirurgische Techniken bei der Implantation

Um ein solches Mikrophotodioden-Array als Photorezeptorenersatz in den subretinalen Raum zu implantieren, wurden bereits verschiedene operative Verfahren erprobt.

1. Bei der Implantation des Chips *ab interno* handelt es sich um ein häufig in der Glaskörper-Chirurgie angewandtes modifiziertes Standard-Vitrektomie-Verfahren, bei dem neben dem Infusionsport und zwei Sklerostomien für chirurgische Instrumente und Beleuchtung noch ein zusätzlicher Schnitt zum Einführen des Implantates gemacht wird.

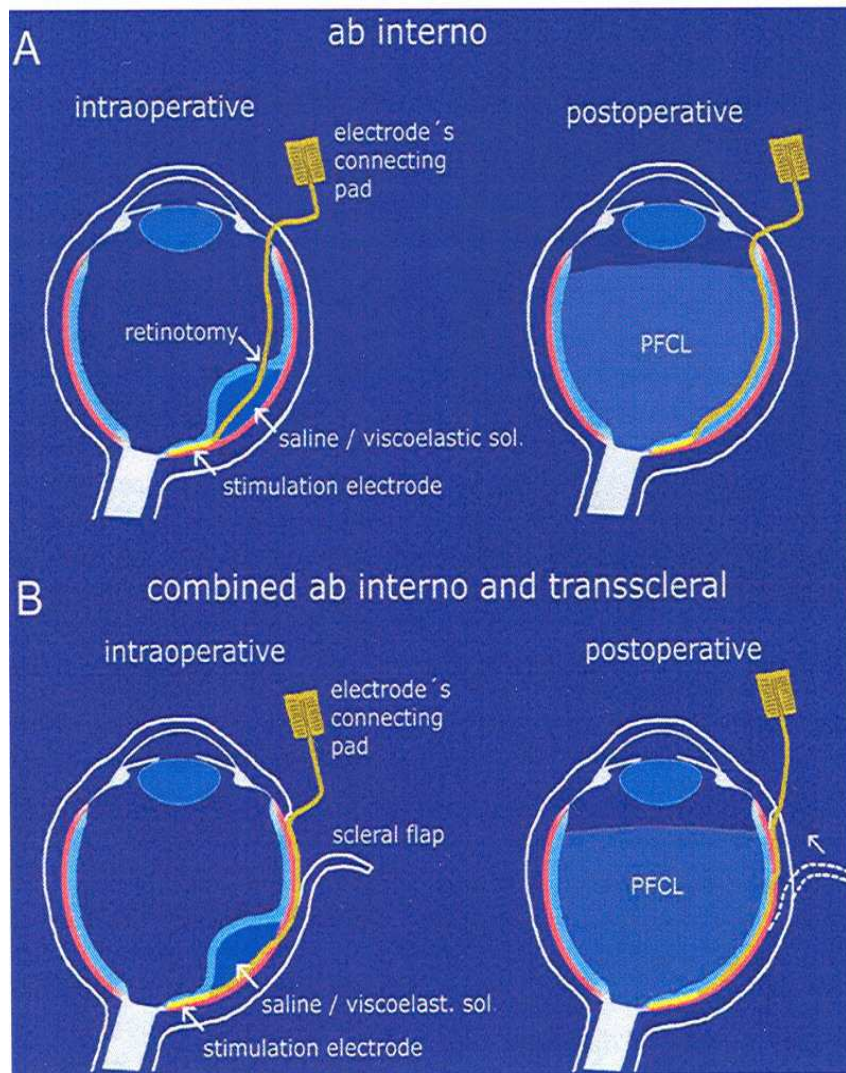
Nach einer Glaskörperentfernung muss zunächst die Retina für die Elektroden-Implantation präpariert werden: Über eine kleine Kanüle injiziert man balancierte Salzlösung (BSS) in den subretinalen Raum, um die Netzhaut abzuheben. Dann wird die so entstandene Blase konventionell geöffnet. Die anschließende Injektion einer viscoelastischen Lösung soll die nachfolgende Implantation der

Stimulationselektroden vom Glaskörperraum her erleichtern. Anschließend wird der Chip an der gewünschten Stelle im subretinalen Raum zwischen Pigmentepithel und neuronaler Retina positioniert. Durch Aspiration entfernt man die injizierten Flüssigkeiten, die Eingabe von Perfluorocarbon (PFCL) führt zu dem gewünschten Wiederanlegen der Netzhaut am Implantat, was für eine gute Signalübertragung essenziell ist.

2. Bringt man den Netzhautchip *ab externo* über einen Schnitt durch Sklera und Choroidea von außen in den subretinalen Raum ein, ist die unzureichende Sichtkontrolle der chirurgischen Vorgehensweisen durch den Operateur sehr von Nachteil. Der kontrollierte Durchtritt durch die Aderhaut ohne Verletzung der Netzhaut unter Vermeidung von Blutungen stellt bei diesem Verfahren ein kaum lösbares Problem dar. Deshalb wurde ein drittes chirurgisches Verfahren entwickelt, welches die Vorteile beider Verfahren verbinden soll.

3. Dabei handelt es sich um eine ***kombinierte ab interno und transsklerale Implantation*** der elektronischen Sehprothese. Auch hier führt man zunächst eine standardisierte Vitrektomie und Pars plana-Lentektomie durch, bevor in der Sklera ein Lappchen präpariert wird und zwar an der Stelle, die der späteren Position des Implantateintritts unter die Retina entspricht. Durch die Injektion einer viscoelastischen Lösung in den subretinalen Raum wird auch hier eine subretinale Blase erzeugt, jedoch nicht gefolgt von einer Retinotomie, sondern um die Netzhaut bei der anschließenden **Inzision der Choroidea** von außen zu schützen. Über den nun freien Weg zum Subretinalraum werden die Elektroden mit Hilfe einer Führungsfolie an der gewünschten Stelle unter die Netzhaut von außen eingeführt. Die injizierte Lösung wird so gut wie möglich entfernt, das Sklera-Lappchen vernäht und wie beim *ab interno*-Verfahren PFCL in den vitrealen Raum eingebracht, um einen möglichst guten Kontakt der Retina zum Chip zu gewährleisten.

Abb. 1.3.³ Vereinfachte Darstellung der zwei unterschiedlichen Implantationstechniken. Während das ab interno-Verfahren (A) eine Retinotomie erforderlich macht, ist bei der kombinierten Methode (B) eine Penetration der Choroidea nötig



Dieses kombinierte Implantationsverfahren hat den großen Vorteil, dass sich ein retinales Trauma aufs Minimale begrenzen lässt, da bei der kombinierten Methode lediglich eine Penetration der Netzhaut mit einer kleinen Kanüle für die Flüssigkeitsinjektion in den Subretinalraum erforderlich ist; das Einführen des

³ aus Schanze T., Sachs H. G. et al., Implantation and testing of subretinal film electrodes in domestic pigs, Experimental Eye Research

Mikroelektrodenchips jedoch erfolgt bei diesem Verfahren nicht transvitreal über eine Retinotomie, sondern von außen transchoroidal. Und die Intaktheit der Netzhaut ist für die Funktion eines retinalen Chips – im Gegensatz zu anderen elektronischen Sehprothesen – essenziell.

Andererseits geht diese Operationsmethode aber mit einem prinzipiellen Problem einher: Um von außen in den subretinalen Raum zu gelangen, ist ein Schnitt durch die mittlere Schicht des Auges, durch die zur Tunica vasculosa (= Uvea) gehörenden Choroidea (Aderhaut) notwendig. Bedenkt man, dass der Hauptbestandteil der Choroidea Blut führende Gefäße sind, deren Blutfluss mit 800 bis 1200 ml pro 100 mg Gewebe pro Minute zum höchsten im Körper gehört, wird deutlich, dass die erforderliche Inzision der Choroidea Probleme mit sich bringt. Das operative Vorgehen des Chirurgen wird im Falle einer starken Blutung in hohem Maße erschwert, wenn nicht gar unmöglich gemacht.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Versuch, das Problem dieses transchoroidalen Verfahrens beim kombinierten ab interno und transskleralen Implantationsverfahrens mit **Radiodiathermie** zu lösen.

1.3. Anatomie und Physiologie der Aderhaut

Zunächst soll einmal auf die Choroidea selbst, die neben Iris und Ziliarkörper den größten Anteil der mittleren Augenschicht (Uvea) einnimmt, auf deren genauen Aufbau und Funktion näher eingegangen werden.

1.3.1. Blutversorgung des Auges

Der Bulbus oculi wird insgesamt von zwei arteriellen Systemen, die beide ihren Ursprung aus der *A. ophthalmica* haben, versorgt: dem ziliaren und dem retinalen System. Letzteres wird von der *A. centralis retinae* repräsentiert, welche zusammen mit dem Sehnerven in das Auge eintritt und für die Ernährung der inneren Netzhautschichten verantwortlich ist. Die arterielle Versorgung aller anderen Anteile

des Auges übernimmt das ziliare System, dem auch die Gefäße der Choroidea entspringen. Folgende Arterien gehören dem ziliaren Gefäßsystem an:

Die *Aa. ciliares anteriores* erreichen den Bulbus innerhalb der geraden Augenmuskeln und teilen sich dann in oberflächliche episklerale Äste, die zur Versorgung von Sklera, Limbus, Iris und Konjunktiva beitragen, und in tiefe Äste; diese laufen zum Gefäßnetz des Ziliarmuskels, rekurrente Arterien erreichen die periphere Choroidea.

Je eine der *Aa. ciliares posteriores longae* durchbricht die Sklera medial und lateral des N. opticus, erreicht nach Durchlaufen eines kurzen Kanals den Suprachoroidalraum, wo die Arterien im horizontalen Meridian nach vorne ziehen, um anschließend des Circulus arteriosus iridis major zur Ernährung der Iris zu bilden.

Der Blutzufluss zur **Aderhaut** geschieht zum allergrößten Teil durch die *Aa. ciliares posteriores breves*: bis auf einige paraoptische Äste um den Sehnerven herum, welche die Versorgung der peripapillären Choroidea übernehmen und hier den Zinn-Haller-Kreis bilden, durchbrechen die meisten Arterien die Sklera temporal des N. opticus. Jeder distale Ast übernimmt die Versorgung einer kleinen Fläche der Choroidea, wobei bei den vorderen Anteilen der Aderhaut auch rekurrente und Perforansarterien der anderen bereits beschriebenen Gefäße des ziliaren Systems beteiligt sind.

1.3.2. Anatomie der Choroidea

a) Überblick

Die Aderhaut umspannt als mittlere Augenschicht den ganzen Bulbus bis zur Ora serrata, durchbrochen vom N. opticus, an dessen Rand sie fest angeheftet ist. Ihre Dicke variiert von 100 µm im vorderen Bereich bis 220 µm hinten, am dicksten ist mit 500 bis 1000 µm das Gebiet über der Macula. Nach innen hin ist die Choroidea von der Bruch'schen Membran begrenzt, an der äußeren Oberfläche befindet sich die Lamina suprachoroidea.

Die **Lamina suprachoroidea** (Lamina Fusca) besteht aus dicht gepackten Lamellen von kollagenen Fasern, die von der Sklera nach vorne ziehen. Dazwischen befinden sich Melanozyten und Fibrozyten und bilden mit ihren Fortsätzen ein sich durchflechtendes Netzwerk. Die Lamina Fusca wird von den Aa. ciliares posteriores breves und longae (letztere werden jeweils noch von einem Ziliarnerven begleitet) durchquert.

Zwischen retinalem Pigmentepithel und innerster Choroideaschicht (Choriokapillaris) befindet sich die ca. 2 µm dicke **Bruch'sche Membran**, auch Lamina vitrea genannt. Von innen nach außen besteht sie aus folgenden Schichten: innere Basallamina (von Pigmentepithel), innere Kollagenschicht, elastische Zone, äußere Kollagenschicht und äußere Basallamina (von Choriokapillaris).

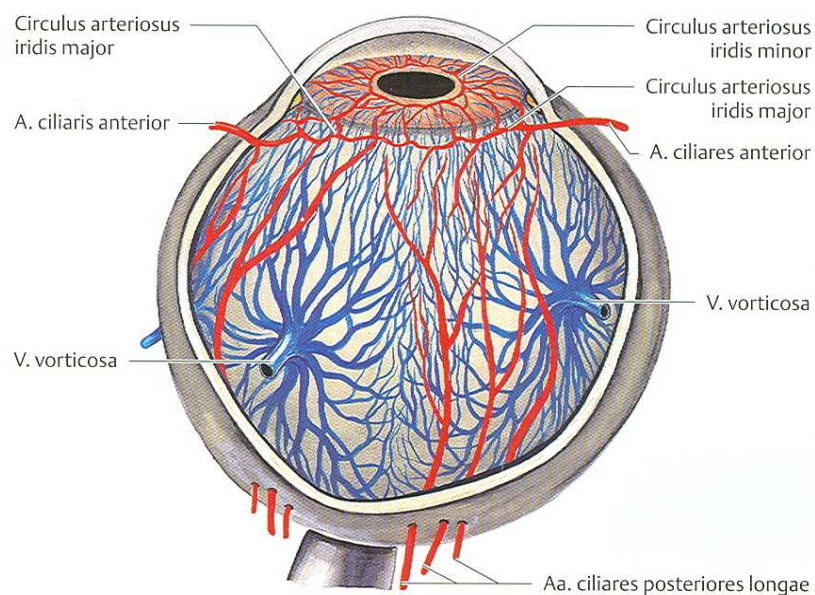


Abb. 1.4.⁴ Überblick: Als mittlere Schicht umspannt die Aderhaut den gesamten Bulbus

⁴ aus Sachsenweger M., Augenheilkunde

b) Schichten, anatomische und funktionelle Einheiten

Die Choroidea selbst wird unterteilt in drei Schichten:

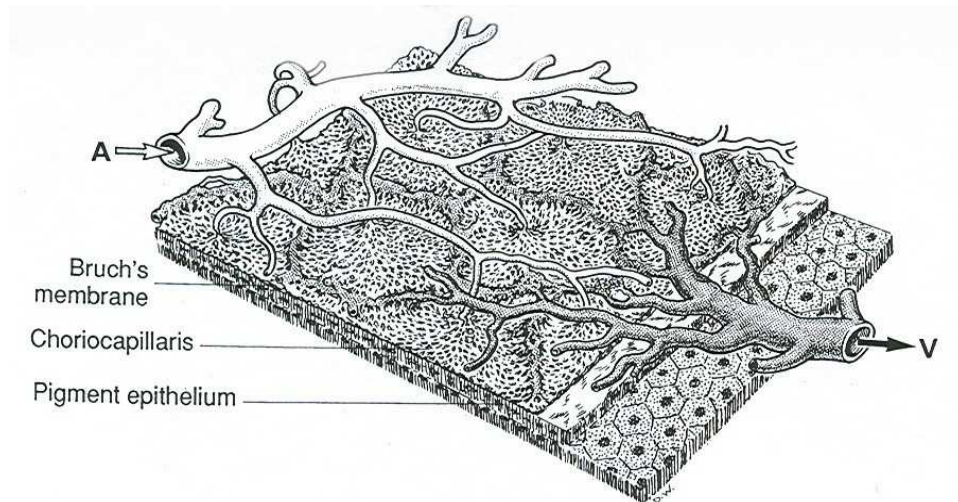


Abb. 1.5.⁵ Schematisierte Darstellung der Aderhaut-Schichten: Ganz außen die Stroma-Schicht mit darauf folgender Choriokapillaris; die Bruch'sche Membran grenzt an das Pigmentepithel der Retina

Ganz außen liegt die **Stroma-Schicht**, in der sowohl die größeren Arterien (nach klassischer Einteilung die Haller'sche Schicht) als auch die mittelgroßen Gefäße und Arteriolen (Sattler'sche Schicht) zu finden sind. Daneben kommen außerdem Nerven, Bindegewebe und zahlreiche Zellen, z.B. Melanozyten, Plasmazellen, Fibrozyten u. a. vor.

In der so genannten **Choriokapillaris** befinden sich die Kapillargefäße. Diese gehen aus der sternförmigen Aufteilung der in der Stroma-Schicht verlaufenden Arteriolen hervor und bilden ein einschichtiges zweidimensionales Netz, welches im Makulabereich und am hinteren Pol sehr dicht, in der Peripherie und der Äquatorregion etwas weiter ist. Die Arteriolen treten entweder senkrecht in die Choriokapillaris ein (meist im hinteren Bereich der Choroidea) oder laufen zuerst

⁵ aus Bron A. J., Tripathi R. C., Tripathi B. J., Wolff's Anatomy of the Eye and Orbit

parallel zum Kapillarbett bevor sie sich in ihm aufteilen (peripher und Äquatorbereich).

Auffällig ist die Formation anatomischer bzw. funktioneller Einheiten, so genannter Lobuli, die je nach Aderhaut-Bereich rund bis polygonal erscheinen können. Arteriozentrische Lobuli, bei denen eine zentral gelegene Endarteriole ein Segment von Kapillaren versorgt und zahlreiche Venolen in dessen Peripherie gelegen sind, bilden dabei die **funktionellen** Einheiten. Die **anatomischen** Einheiten sind dagegen venozentrisch: Im Zentrum des anatomischen Lobulus liegen eine oder mehrere Venolen, während sich peripher die Arteriolen befinden. Nicht in der gesamten Choroidea ist die Lobuli-Verteilung gleich: im vorderen Bereich und in Richtung Peripherie werden die Segmente unregelmäßiger und größer (mit einem durchschnittlichen Lobulus-Durchmesser von $950 \times 670 \mu\text{m}$ peripher im Gegensatz zu $510 \times 450 \mu\text{m}$ am hinteren Pol), in der Makula-Region und peripapillär sind gar keine Lobuli zu erkennen; hier sind die Kapillaren Honigwaben-ähnlich miteinander verknüpft.

Zwischen dem kapillaren Netzwerk finden sich Bündel von kollagenen Fasern als interkapilläre Septen. Besonders zu erwähnen ist außerdem das abnorm große Kaliber der Kapillargefäße in der Choroidea: Der Durchmesser von 8 bis $20 \mu\text{m}$ entspricht der dreifachen Größe eines Erythrozyten

Die **Bruch'sche Membran**, auch Lamina vitrea genannt, entspricht der dritten Schicht der Choroidea.

Abb. 1.6.⁶ Die Struktur der Aderhaut zeigt ein typisches Gefäßmuster (hier aus dem äquatorialen Bereich)

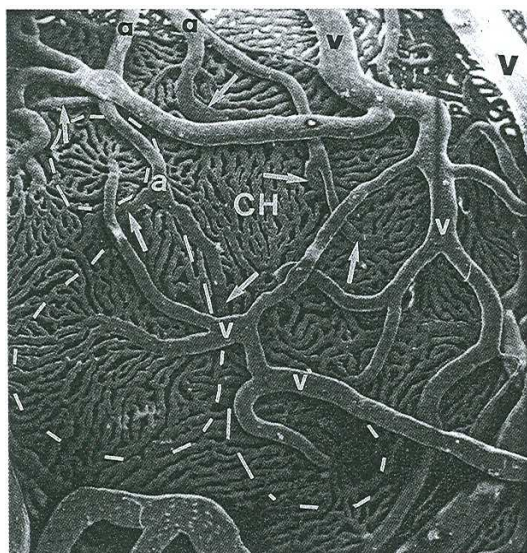


Abb. 1.7. und 1.8.⁷ Elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Chorioidea; aus der Stroma-Schicht treten Arteriolen (A bzw. a) in die zweidimensionale Choriokapillaris (CH) ein.

⁶ aus Wiederholt M., H. u. B. Bräuer, Excerpta ophthalmologica

⁷ aus Bron A. J., Tripathi R. C., Tripathi B. J., Wolff's Anatomy of the Eye and Orbit

c) Venöses System

Die choroidalen Venen fließen zu den vier **Vv. Vorticosae** (meist zwei obere und zwei untere) zusammen, welche die Sklera jeweils seitlich eines geraden Augenmuskels ca. 6 mm schräg hinter dem Äquator durchbohren. Sie passieren die Sklera in einem kurzen Kanal und ziehen dann zur Mitte konvergierend und geschlängelt nach hinten. Über die Vv. vorticosae fließt das Blut des gesamten Uvealtraktes in die Vv. ophthalmica superiores bzw. inferiores ab, sie erhalten also auch Zuflüsse aus der vorderen Choroidea-Region, der Iris und dem Ziliarkörper.

Nur ein kleiner Teil des Blutes aus dem Ziliarmuskel gelangt in die **Vv. ciliares anteriores**, dem kleineren zweiten venösen System der Uvea.

Insgesamt korrespondieren Arterien und Venen bezogen auf Anzahl, Verlauf und Aufteilung in der Tunica vasculosa sehr wenig.

1.3.3. Physiologie der Aderhaut

Wie bereits erwähnt gehört die Aderhaut mit einem durchschnittlichen Blutfluss von 677 mg/ ml zu den am besten durchbluteten Organen des menschlichen Körpers, die choroidale Perfusion übersteigt die der Netzhaut oder eines vergleichbaren Abschnittes im Gehirn um das 20fache. 70 bis 80 % des retinalen Sauerstoffbedarfs werden über das Aderhaut-System gedeckt, nur 20 bis 30 % vom retinalen. Betrachtet man jedoch die O₂- Sättigung der choroidalen Venen, liegt diese nur ca. 3 % unter der arteriellen, woraus folgt, dass die Perfusionsrate weit die nutritiven Anforderungen übersteigt. Man vermutet, dass die hohe Durchblutungsrate auch thermoregulatorische Funktionen erfüllen und so das vordere Auge und die Retina bei starker Lichtexposition vor Überhitzung schützen soll.

In Bezug auf die Kapillaren fällt eine sehr starke Fenestrierung der Gefäße auf, die Durchlässigkeit des Endothels übersteigt sogar jene der Niere. Die daraus resultierende extravaskuläre Albuminkonzentration von 60 - 70 % des Plasmas hat einen sehr hohen onkotischen Druck zur Folge, was zum einen den Flüssigkeitsübertritt von Retina zu Choroidea erleichtert, zum anderen schützt der dadurch entstehende Sog auch vor einer Ablösung der Netzhaut vom Pigmentepithel.

Wegen der tight junctions der Zellen des Pigmentepithels ist aber ein ungehinderter Übertritt großer und evtl. toxisch wirkender Moleküle zur Retina nicht möglich.

Steigt der CO₂-Partialdruck in der Choroidea, so beobachtet man auch eine Zunahme des Blutflusses, der O₂-Druck hat keinen Einfluss. Im Gegensatz zur Retina ist die choroidale Durchblutung allerdings nicht autoreguliert, Änderungen des Perfusionsdruckes bewirken auch eine proportionale Blutfluss-Änderung in der Aderhaut. Unter normalen Umständen sind die choroidalen Gefäße immer zum Schutz von Papilla und Retina vor Überperfusion unter einem vasokonstriktorischem Tonus. Cholinerge Stimulation der Arteriolen bewirkt eine Vasodilatation, α -adrenerge Fasern eine Konstriktion.

1.4. Fragestellung und Ziel dieser Arbeit

Durch die soeben dargestellte komplexe Schicht der Bulbuswand soll also eine Penetration erfolgen, um das kombinierte ab interno und transsklerale Verfahren zur Implantation eines subretinalen Chips anwenden zu können. Eine Blutung muss dabei aber vermieden werden, da dies die Arbeit des Chirurgen sehr einschränkt, wenn nicht gar unmöglich macht, und selbst kleine Blutungen in den Subretinalraum zu erheblichen Konsequenzen führen.

Wie kann also der Schnitt durch die Aderhaut des Auges, welche mit zu den am stärksten perfundierten Organen des menschlichen Körpers gehört, und deren hauptsächlichster Bestandteil Blutgefäße sind, gelingen, ohne dass dabei eine starke Blutung die Vorgehensweise und den chirurgischen Erfolg des Operateurs behindert? Zur Lösung dieses Problems wurde die Aderhaut experimentell mit dem **Radiodiathermie-Verfahren** mit anschließender Inzision bearbeitet, wobei zuvor die für diese Anwendung geeigneten Geräteparameter evaluiert werden mussten.

In dieser Arbeit sollen nun die Ergebnisse der Anwendung dieser Radiowellen-Technologie auf die Bulbuswand, insbesondere auf die Choroidea histologisch untersucht werden.

2 METHODEN

2.1. Möglichkeiten der Blutungsverhinderung

Wie kann man eine Blutung bei der Penetration der Aderhaut verhindern?

Von den grundsätzlichen Möglichkeiten einer intraoperativen Blutstillung lassen sich auf dem Gebiet der Ophthalmologie prinzipiell die im Folgenden beschriebenen Methoden anwenden.

2.1.1. Verschiedene konventionelle Methoden der Blutstillung

Häufigen Einsatz findet die **lokale Vasokonstriktion**:

Verwendet werden α -Sympathomimetika, vor allem Adrenalin und Noradrenalin, durch deren vasokonstriktorische Wirkung das Operationsgebiet schwächer durchblutet und somit die Blutungsneigung verringert wird. Diese Substanzen werden oft auch mit Lokalanästhetika kombiniert, da sich aufgrund der Gefäßverengung der Abtransport des Anästhetikums verzögert, wodurch eine längere lokale Wirkdauer erreicht wird.

Daneben ergibt sich die Möglichkeit der **systemischen Blutdrucksenkung**:

Durch die Senkung des systemischen Blutdrucks vermindert sich auch der Perfusionsdruck in den Aderhaut-Gefäßen (der choroidale Blutfluss wird nicht autoreguliert!), was wiederum die Blutungsneigung reduziert. In Frage kommen hierfür zum einen am Sympathikus angreifende Substanzen, nämlich α -Rezeptoren-Blocker, β -Rezeptoren-Blocker und Antisymphotonika (z.B. das zentralwirkende α_2 -Sympathomimetikum *Clonidin*). Zum anderen können zur systemischen Blutdrucksenkung auch Vasodilatoren mit direktem Angriff an der glatten Muskulatur verwendet werden. Zu dieser Substanzgruppe gehören beispielsweise *Dihydralazin* und *Nitroprussidnatrium* sowie *Minoxidil* und *Diazoxid*.

Im Falle der bei der subretinalen Sehchip-Implantation erforderlichen Aderhaut-Penetration können die eben erwähnten Methoden aber nur mit mäßigem Erfolg eine Blutung verhindern.

Ein weiteres mögliches Verfahren stellt die **konventionelle Hochfrequenzdiathermie** dar. Die Wirkung der Hochfrequenz-Technik beruht auf der Entstehung von Wärmeenergie beim Durchfließen von hochfrequentem Strom (des Frequenzbereichs 10^6 - 10^{10} Hz) durch einen elektrischen Widerstand (also durch das Gewebe) über zwei Diathermielektroden. Als inaktive Elektrode wird eine ausgedehnte Metallplatte mit dem Körper in Berührung gebracht; in der Umgebung der sehr viel kleineren aktiven Elektrode tritt eine starke Verdichtung des entstehenden elektrischen Feldes und damit eine hohe Wärmeentwicklung auf. Je nach Form und Größe dieser aktiven Elektrode kann man die behandelten Gewebereiche regelrecht “zerkochen” (Elektrokoagulation) oder zerschneiden (Elektrotomie). Die von der Wärme hervorgerufenen Veränderungen hängen von der Temperatur und der Einwirkzeit ab: Bei einer Temperatur von etwa 57 Grad Celsius tritt die Phase der Eiweißdenaturierung auf, was unter anderem eine Koagulationsnekrose und somit eine Gewebszell-Schrumpfung zur Folge hat. Bei den betroffenen Gefäßen führt dies zur Verengung bis zum völligen Verschluss. Ist die Leistung zur Denaturierung der Gefäßwandstruktur zu gering, kommt es durch die dadurch bedingte längere Koagulationsdauer zu erhöhter thermischer Schädigung des umliegenden Gewebes. Wird jedoch zu viel Energie zugeführt, siedet die Gewebsflüssigkeit bzw. das Gefäß wird verkohlt (karbonisiert).

In der modernen Ophthalmologie spielt die Verwendung der Hochfrequenzdiathermie z.B. bei der Korrektur der Netzhautablösung eine Rolle.

2.1.2. Verwendung des Diodenlasers

Die Anwendung von Laserlicht zur Koagulation des Fundus ist in der Ophthalmologie ein schon lange etabliertes Verfahren mit einem breiten Anwendungsfeld. Die Lichtabsorption am Augenhintergrund erfolgt durch die drei wichtigsten Pigmente am Auge, nämlich Hämoglobin, Xanthophyll und Melanin, wobei letzteres die Hauptrolle spielt. Auf Art und Ausmaß der erreichten Koagulation nehmen zahlreiche Expositionsparameter wie Laserleistung, Expositionszeit, Größe des Bestrahlungsareals und Wellenlänge Einfluss.

Um eine effektive Blutungsstillung an der Aderhaut erreichen zu können, muss aus der bisher entwickelten Vielzahl unterschiedlicher Laserarten eine Anwendung mit entsprechend guter Wirkung an der Choroidea gewählt werden.

Wie aus der Graphik in Abb. 2.1. hervorgeht, ist für den Versuch einer choroidalen Blutstillung der mit einer Wellenlänge von 810 nm wirkende Diodenlaser eine geeignete Wahl. Während beispielsweise bei dem mit 514 nm arbeitenden Argonlaser bereits 99% der Laserleistung vom retinalen Pigmentepithel (RPE) absorbiert werden, kommt es bei einer Wellenlänge von 810 nm nur zu einer 30%igen Absorption und dadurch zu einer besseren Wirkung im Aderhautbereich.

Laserdioden sind Halbleiterquellen, deren Strahlen durch eine Wechselwirkung von Photonen mit Ladungsträgern im Valenz- und Leitungsband des Kristalls erzeugt werden. Der Laser funktioniert nach dem Prinzip der stimulierten Emission: Ein entsprechend starker Stromfluss durch die aktive Schicht hebt Elektronen in einen angeregten Zustand, welche dadurch unter Abgabe von Photonen vom Leitungs- in das Valenzband springen; ein Teil dieser Photonen verlässt nach Passage eines Systems aus parallelen Spiegeln als Laserstrahl die Diode.

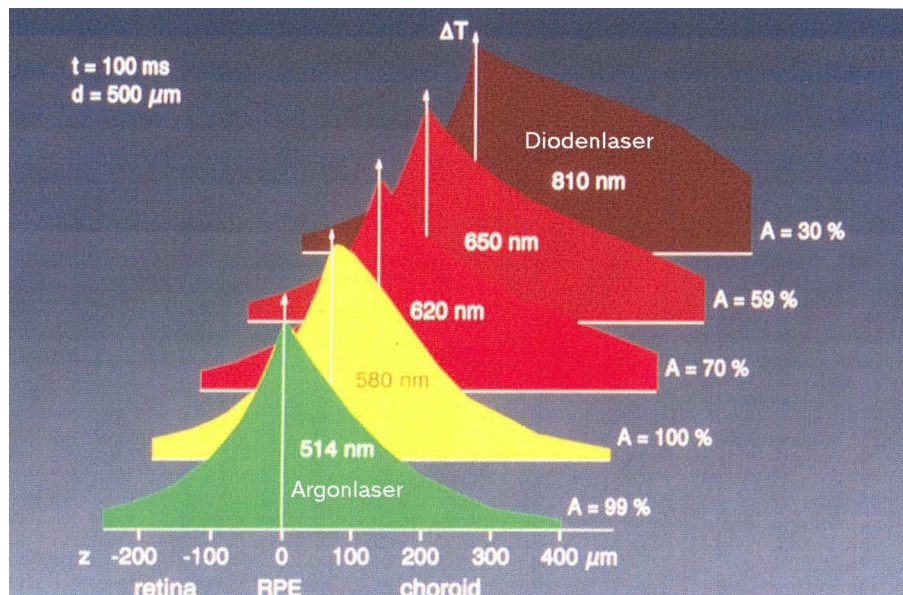


Abb. 2.1. Vergleich unterschiedlicher Lasertypen: Die Absorption A ändert sich mit der Wellenlänge der emittierten Laserstrahlung.

Eine weitere Möglichkeit der Blutungsverhinderung soll im nächsten Punkt erörtert werden.

2.2. Radiodiathermie

“We can say, without exaggerating, that radiosurgery changed our lives dramatically, personally und professionally. ... We encourage all physicans to learn the techniques of radiosurgery...”⁸

Dieses Zitat von Stephen Bosniak und Marian Cantisano Zilkha zeugt von den großen Erfolgen der Radiodiathermie auf dem Gebiet der okuloplastischen Chirurgie. Welche Ergebnisse deren Anwendung zur Aderhaut-Penetration erbringt soll untersucht werden.

2.2.1. Funktionsprinzip

Bei der Radiodiathermie werden Radiowellen mit einer Frequenz von 4 MHz, die von einer aktiven zur passiven Elektrode wandern, durch ein dazwischen liegendes Gewebe geschickt. Aufgrund der natürlichen Resistenz der jeweiligen Zellen heizt sich das Gewebe bei der Passage der Radiowellen auf, was eine Dehydratation zur Folge hat. Je nach Form und Ausmaß der verwendeten Wellen (siehe Punkt 2.2.2) und der Form der aktiven Elektrode kann somit eine Koagulation und zugleich eine Gewebe-Inzision erreicht werden. Das Radiofrequenz-Verfahren erlaubt also eine Gewebe-Inzision mit gleichzeitiger Hämostase.

In der **Funktionseinheit**, bestehend aus Transformator, Verstärker, Gleichrichter und anderen elektrischen Funktionen, werden zunächst Gleichstrom und dann Radiowellen erzeugt, welche zu einem Adapter gelangen. Dort werden Wellenlänge und -höhe in gewünschter Weise modifiziert, und nach anschließender Amplifizierung erfolgt die Übertragung zu den Elektroden.

⁸ aus Aimino G., Davi G., Santella M., Oculoplastic Surgery With Radiofrequency

Die **aktive Elektrode**, ein dünner Metalldraht, kann als Schneidespitze fungieren, welche die Radiowellen durch das Gewebe leitet und in die für den Verwendungszweck passende Form gebogen werden kann. Da eine Inzision aufgrund des Radiosignals erfolgt, braucht mit der Elektrode kein Druck auf das Gewebe ausgeübt zu werden. Je nach Anforderung können verschiedene Formen von Elektroden-Drähten benutzt werden: Gerade Drahtspitzen, runde, dreieckige oder ovale Schleifen oder ballförmige Elektroden; sehr dünne Drähte verursachen weniger Gewebeschäden, dickere bringen eine bessere Koagulation mit sich, da diese eine stärkere Intensität und somit Hitzeentwicklung aufweisen. Für eine optimale Handhabung wird die Elektrode an Skalpellgriff-ähnlichen Handgriffen befestigt.

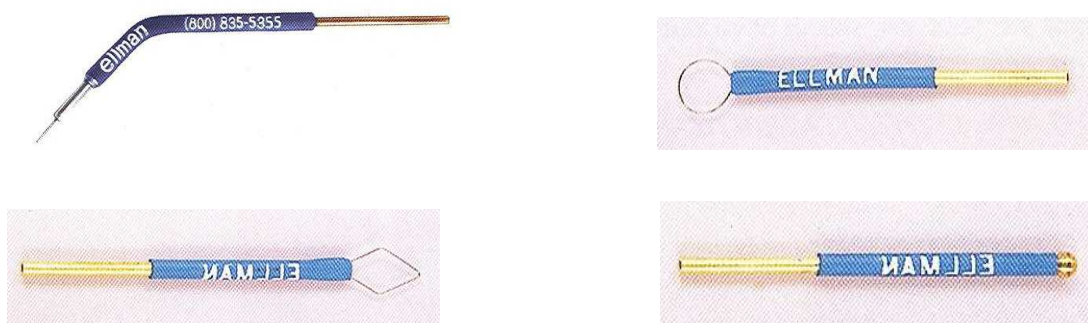


Abb. 2.2.⁹ Als aktive Elektrode können je nach Anforderung verschieden Formen verwendet werden.

Nach Passage des zu behandelnden Gewebes werden die Radiowellen von der **passiven Elektrode**, welche als eine Art Antenne fungiert, wieder aufgefangen. Am häufigsten wird hierzu eine Metallplatte verwendet, wobei darauf zu achten ist, dass andere metallische Gegenstände (z.B. Befestigungsclips), die als Konduktoren dienen und zu Verbrennungen führen könnten, nicht berührt werden. Am sichersten sind deshalb passive Elektroden, bei denen alle Metalloberflächen isoliert sind. Passive

⁹ aus Aimino G., Davi G., Santella M., Oculoplastic Surgery With Radiofrequency

Elektroden in Form von Metall-Armbändern für den Operateur oder Stäben, die vom Patienten gehalten werden, sind eher von Nachteil. Mit zunehmender Nähe der Elektrode zum Operationsgeschehen wird eine geringere Intensität des elektrischen Signals benötigt.

2.2.2. Verschiedene Typen von Radiowellen und deren Anwendung

Je nach Ziel und Art einer Operation werden beim Radiodiathermie-Verfahren insgesamt vier unterschiedliche Typen von Wellen angewandt (siehe Abb.2.3.).

1. Der **vollständig gefilterte und gleichgerichtete** Strom erscheint auf dem Oszilloskop als glatte ununterbrochene, nicht modulierte Radiowelle. Der kontinuierliche nicht-pulsierende Fluss hochfrequenter Wellen erlaubt eine Skalpell-ähnliche Inzision, die aufgrund der geringen lateralen Hitzeentwicklung auch knochenah angewandt werden kann und die wenigsten Gewebeveränderungen nach sich zieht. Diese Wellen-Art, die zu 90 % schneidet und nur zu 10 % koaguliert, eignet sich besonders für chirurgische Prozesse, die ein minimales Trauma erfordern, als Beispiele im okuloplastischen Bereich seien Hautinzisionen, Lid-Tumoren oder sämtliche Arten kosmetischer OPs wie kosmetische Blepharoplastie genannt.

2. Eine Inzision mit gleichzeitiger Koagulation (jeweils 50 %) wird mit der **vollständig gleichgerichteten** Welle erreicht. Da hier zu beiden Seiten der aktiven Elektrode mehr Hitze entsteht, ist diese Art nicht für Schnitte nahe des Knochengewebes indiziert. Anwendung findet sie beispielsweise beim Papillom, Basalzellkarzinom, bei Warzen, Abszessen oder Fisteln.

3. Der intermittierende Fluss hochfrequenter Wellen bei der **partiell gleichgerichteten** Form eignet sich besonders gut zur Hämostase (90% Koagulation). Meist wird diese Art in Verbindung mit dickeren Elektroden, z.B. ballförmigen, verwendet, wegen der starken lateralen Hitzeentwicklung und Geweberetraktion jedoch ebenfalls nicht in Knochennähe. Diese Form ist zur Hämostase, bei Trichiasis

und Teleangektasie indiziert.

4. Die größte laterale Hitze entwickelt sich bei der **“Fulguration”**- Form, die auf dem Oszilloskop als regelloser Stromfluss erscheint. Der Halbwellen-Strom hat einen stark dehydrierenden Effekt auf das Gewebe und kann für Koagulationen und Destruktionen, z.B. zur Entfernung von Zysten, Warzen oder Tumoren verwendet werden. Sofern die Elektrode das Gewebe nicht berührt, ist auch eine knochenaher Gebrauch möglich.

Die schon mehrmals erwähnte Hitzeentwicklung auf das umliegende Gewebe hängt von mehreren Faktoren ab. Diese sind genau zu beachten, da eine zu starke Hitzeeinwirkung Gewebsnekrosen zur Folge haben kann.

$$\mathbf{LH = T \times W \times S \times I \times F}$$

Wie aus der Formel hervorgeht, ist die laterale Hitzentwicklung (LH) ein Produkt aus der Zeit (T), in der die Radiowellen das Gewebe durchdringen (eine Inzision mit einer Geschwindigkeit von 7 mm/s bewirkt die geringste Hitzeentwicklung), aus der Wellenform (W), der Oberfläche, mit der die Elektrode in Kontakt ist (S), und der Intensität des Stromes (I): Ist sie zu hoch gewählt, verbrennt das Gewebe, ist sie andererseits zu gering, erfolgt eine ungenügende Trennung der Zellen, die Elektrode bleibt quasi stecken.

Auch die Frequenz (F) der Radiowellen trägt zur lateralen Hitze bei: Vielen Studien zu Folge sollte diese idealer Weise bei 3,8 MHz liegen.

Je nach Anwendungsziel müssen diese Parameter unterschiedlich variiert werden. Für die Anwendung an der Choroidea wurden verschiedene Geräteeinstellungen geprüft, damit ein optimales Behandlungsergebnis erreicht werden konnte.

Abb. 2.3.¹⁰ Je nach Art und Ziel einer Operation stehen vier verschiedene Wellen-Arten zur Verfügung

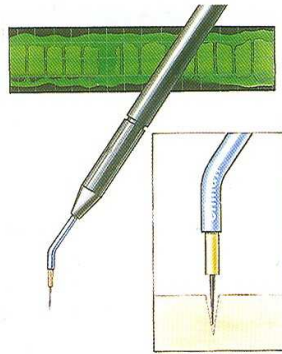


Figure 2.2
Fully rectified and filtered current.

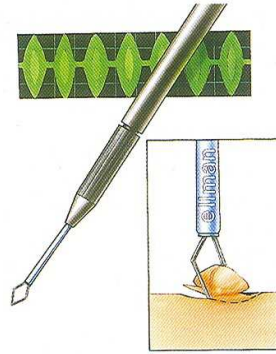


Figure 2.3
Fully rectified current.

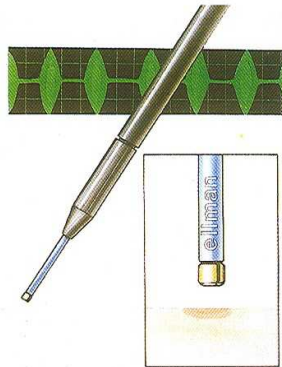


Figure 2.4
Partially rectified current.

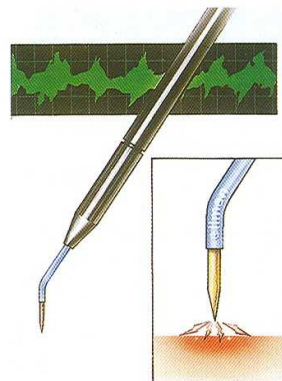


Figure 2.5
Fulguration.

¹⁰ aus Aimino G., Davi G., Santella M., Oculoplastic Surgery With Radiofrequency

2.2.3. Radiodiathermie im Vergleich mit Skalpell und Laser

Viele operative Verfahren, bei denen die Radiodiathermie Anwendung findet, wurden und werden auch mit dem Skalpell oder Laser ausgeführt. Einige Unterschiede und Gemeinsamkeiten dieser drei Methoden sind im Folgenden tabellarisch dargestellt.

Skalpell	Laser	Radiofrequenz
Form unveränderlich	Strahlenemission flexibel	Elektroden Spitze in gewünschte Form biegsam
Druckausübung zur Inzision nötig	Druckausübung nicht erforderlich	Druckausübung nicht erforderlich
Narbenbildung	keine oder kaum sichtbare Narben	keine oder kaum sichtbare Narben
Blutung kann Sicht behindern	keine oder wenig Blutung durch gleichzeitige Koagulation (Gefäß-Durchmesser < 0,5 mm) verbessert Sicht	keine oder wenig Blutung durch gleichzeitige Koagulation verbessert Sicht
Inzision nicht steril, Skalpell selbst muss sterilisiert werden	Sterile Inzision, selbststerilisierend Griff nicht autoklavierbar	Elektroden und Griff autoklavierbar
	Hohe Kosten für Instandhaltung, Reparatur etc.	Einfachere Instandhaltung und Reparatur

Tab. 2.1. Radiodiathermie im Vergleich mit Skalpell und Laser

Studien zu Folge, in denen ein Vergleich zwischen "konventioneller" Lasermethode (CO₂-Laser) und Radiofrequenz-Anwendung angestrebt wurde, bringt das Radiodiathermie-Verfahren vor allem auf dem Gebiet der okuloplastischen Chirurgie deutliche Verbesserungen mit sich.

Im Folgenden sollen nun die Auswirkungen deren Anwendung auf die Aderhaut histologisch untersucht werden.

2.3. Präparate

2.3.1. Herkunft und Behandlung der histologisch untersuchten Präparate

a) Operationsverfahren

Die in dieser Arbeit hauptsächlich histologisch untersuchten Präparate entstammen dem linken Auge eines deutschen Landschweins. Mit der Radiodiathermie wurde eine experimentelle operative Behandlung in folgender Art und Weise durchgeführt:

Nach der zirkulären Eröffnung der Bindehaut und dem Anschlingen der Sklera bei posterior wurde im nasal exponierten Skleraanteil ein ca. 5 x 7 mm großes Areal markiert. Mit Bonnerpinzette und Messer erfolgte zunächst eine Präparation bis zur Suprachoroidea, die anschließend mit dem Vannas Scherchen eröffnet wurde. Nach Ablassen von etwas Flüssigkeit aus dem Auge zur Tonus-Senkung wurde die Suprachoroidea weiter entfernt bis ein ca. 5 x 5 mm großes Aderhaut-Areal frei lag. In diesem Bereich der Choroidea wurde im Anschluss die Radiodiathermie-Methode in der **“Fulguration”-Form**¹¹ angewandt. Bei der darauf folgenden kleinen Inzision in die Aderhaut zeigte sich keine Blutung. Danach wurde das gesamte Areal freipräpariert und für die Histologie gesichert.

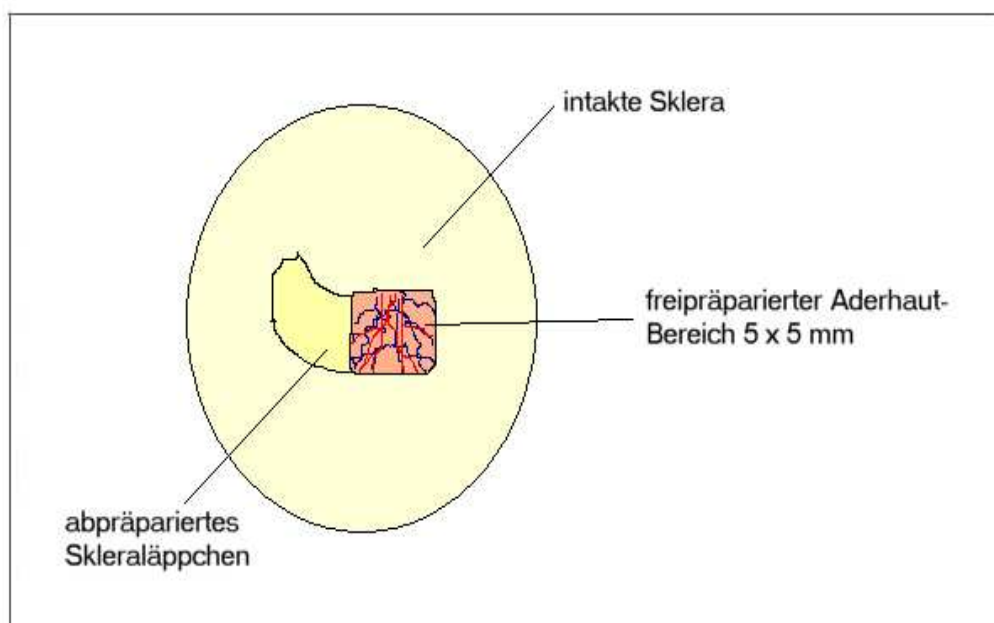
Abb. 2.4. zeigt eine schematisierte OP-Skizze.

Zusätzlich wurden Aderhaut-Präparate weiterer Tiere angefertigt, bei denen andere Geräteeinstellungen der **Radiodiathermie** getestet, ansonsten aber nach denselben in diesem Kapitel beschriebenen Methoden bearbeitet und für die Histologie aufbereitet wurden.

¹¹ genaue Bezeichnung des verwendeten Gerätes: siehe Anhang

Bei einem weiteren Schwein wurde außerdem versucht, eine chorioidale Blutstillung mittels Verwendung des in Punkt 2.1.2. beschriebenen **Diodenlasers**¹² zu erreichen; dabei wurde das Gewebe mit der Endosonde im Non-Contact-Verfahren mit einer geringen Geschwindigkeit überstrichen, bis eine Veränderung des dunklen Aderhautgewebes gerade eben sichtbar war. Bei einer Laserleistung von knapp unter 1000 mW waren derartige Gewebeveränderungen feststellbar. Alle weiteren Bearbeitungsschritte entsprechen ebenfalls den hier dargestellten Methoden.

Abb. 2.4. Schematisierte OP-Skizze:



b) Präparation des Gewebes zur histologischen Untersuchung

Nach Umschneiden des für die Untersuchung interessanten Bereiches mittels Skalpell und Schere wurde das Gewebe zur sofortigen Fixierung und Konservierung in 4 %

¹² genaue Bezeichnung des verwendeten Gerätes: siehe Anhang

Paraformaldehyd in PBS-Puffer (pH 7,4) eingelegt, um den augenblicklichen Zustand und die Struktur nach der Operation möglichst genau festhalten zu können. Die Einbettung der Gewebeproben in Paraffin und die davor notwendigen Arbeitsschritte - Auswaschen der Fixierflüssigkeit, stufenweise Entwässerung der Präparate in aufsteigender Alkoholreihe und Entfernung des Alkohols durch ein Intermedium (Xylol) - wurden mittels eines Einbettautomaten¹³ erledigt.

Mit dem Rotationsmikrotom¹⁴ wurden zahlreiche 2 µm dicke Schnitte des zu untersuchenden Gewebes angefertigt und auf die spezialbeschichteten Objektträger Super Frost® Plus (Menzel-Gläser) aufgebracht.

Nach der Abschmelzung des Paraffins von den Objektträgern im Brutschrank (20 Minuten bei 65°C) konnten die so angefertigten Gewebeschnitte nach den unten beschriebenen Methoden für die histologische Untersuchung gefärbt bzw. immunhistochemisch bearbeitet werden.

2.3.2. Übersichtsfärbung mit Hämalaun-Eosin

Zur lichtmikroskopischen¹⁵ Untersuchung wurden aus einem Teil der angefertigten Gewebeschnitte mit der H&E-Färbung Übersichtspräparate hergestellt. Die dafür notwendigen Schritte von der Entparaffinisierung bis zum Eindecken der fertig gefärbten Präparate sind in Tabelle 2.2. dargestellt.

Bei dieser histologischen Routine-Färbung erscheinen Zellkerne, Ribosomen und RER-reiche Regionen blauviolett, Zytoplasma-Anteile, kollagene Fasern und Muskelzellen rosa bis rot, elastische Fasern ungefärbt bis rosa, Erythrozyten rot.

¹³ genaue Bezeichnung des Gerätes und Arbeitsschritte: siehe Anhang

¹⁴ genaue Bezeichnung des Gerätes: siehe Anhang

¹⁵ Bezeichnung der Mikroskope: siehe Anhang

2.3.3. Apoptose und TUNEL-Test

Der andere Teil der hergestellten Objektträger wurde einem speziellen Testverfahren unterzogen, mit dem es möglich ist, apoptotische Zellen in situ zu identifizieren: dem TUNEL (= TdT-mediated dUTP nick end labeling) - Test.

Unter Apoptose versteht man eine Form des intravitalen Zelltodes, dem eine programmartige Abfolge von molekular definierten Teilschritten zugrunde liegt. Zellen, die sich in Apoptose befinden, durchlaufen charakteristische Stadien struktureller Veränderungen von Cytoplasma und Kern, wobei die Mechanismen, die entscheiden, ob eine Zelle apoptotisch untergeht oder nicht, teils über Rezeptoren, teils über intrazelluläre Signale vermittelt sind. In der gemeinsamen Endstrecke der zahlreichen proapoptotischen Vorgänge kommt es u.a. zur Aktivierung einer proteolytischen Kaskade, bei der es auch zur Spaltung der DNA in einzel- und doppelsträngige Oligonucleotid-Fragmente kommt.

Genau dieser biochemische Vorgang dient beim verwendeten Testverfahren zur Identifizierung apoptotischer Zellen in Geweben: An die freien 3'OH-Enden der im Falle einer Apoptose entstehenden DNA-Fragmente werden mittels des Enzyms TdT (Terminal desoxynucleotidyl Transferase) modifizierte Nukleotide angebaut (TUNEL-Reaktion), welche durch spezielle Verfahren (Reaktion dieser mit TUNEL-POD + Chromogensubstrat oder durch Fluorescein) sichtbar gemacht werden können.

Die einzelnen Arbeitsschritte dieser schnellen und präzisen Methode zur Identifizierung und Quantifizierung apoptotischer Zellen sind in Tabelle 2.3. dargestellt.

Zur Überprüfung der richtigen Durchführung des Tests wurden zusätzlich jeweils zwei Kontroll-Objekte angefertigt: Als Positivkontrolle dient ein mit DNase inkubierter Objektträger, bei dem aufgrund der dadurch entstandenen freien 3'OH-Enden eine Detektion der DNA-Fragmente erfolgen muss, bei der Negativkontrolle kann wegen des nicht zugegebenen Enzyms keine Polymerisation der Nukleotide erfolgen.

Die für den TUNEL-Test verwandten speziellen Substanzen entstammen dem *In Situ* Cell Death Detection Kit der Firma Roche.

Tab. 2.2.: Arbeitsschritte bei der H&E-Übersichtsfärbung

Prozedur	Lösungen	Laufzeit
Deparaffinisieren	Xylol	2 x 10 min
	absteigende Alkoholreihe: 2 x 100%, 1 x 96%, 80%, 70%	je 2 min
Aqua dest.		2 min
Kernfärbung und Bläuen	Meyers Hämalaun Wässern in fließendem Leitungswasser	5 min 10 min
Aqua dest		2 min
Cytoplasma-Färbung	Eosin	10 min
Entwässern	aufsteigende Alkoholreihe	je 2 min
	Xylol	2 x 10 min
Eindecken	Depex	

Tab. 2.3. Arbeitsschritte beim TUNEL-Test

Prozedur	Substrat	Dauer
Deparaffinisieren anschließend: 3 x Aqua bidest.	Xylol absteigende Alkoholreihe: 2 x 100%, 1 x 95%, 70%	2 x 10 min je 2 x 3 min
Blockierung der endogenen Peroxidase anschließend 2 x Aqua bidest.	3 % H ₂ O ₂ /70 % Ethanol	20 min
Positivkontrolle: Inkubation mit DNase anschließend 3 x Spülen mit PBS		30 min bei 37 °C
TUNEL-Reaktion: Inkubation mit TUNEL-Reagens anschließend 3 x Spülen mit PBS	25 µl Enzym + 475 µl Labeling-Reagent (verd. 1:20) Negativ-Kontrolle: nur Labeling-Reagent	30 min bei 37 °C
Blockierung unspezifischer Proteine	2 % BSA/PBS	10 min bei RT
Inkubation mit TUNEL-POD anschließend 3 x Spülen mit PBS	TUNEL-POD 1:2 verd. in 2 % BSA/PBS	30 min bei 37 °C
Inkubation mit AEC-Chromogen- Substrat (DakoCytomation) Stopp der Färbung in 3x Aqua dest.		zeitl. Kontrolle durch mikroskopische Beobachtung d. Positivkontrolle
Gegenfärbung anschließend 1x Aqua dest.	Meyers Hämalaun, Bläuen in Leitungswasser	
Eindecken	Aquatex (Merck)	

3 ERGEBNISSE

3.1. Histopathologische Untersuchung des mit Hämalaun-Eosin gefärbten Objektes

Hinweis: Die nachfolgenden Untersuchungen beziehen sich auf die Aderhaut-Präparate, welche mit der **“Fulguration“**-Form der Radiodiathermie bearbeitet wurden.

3.1.1. Überblick

Betrachtet man das Präparat zunächst in der Übersicht, um einen groben Überblick über die Gewebearchitektur zu erhalten, erkennt man die dreischichtige Wand des Bulbus - im mittleren Bereich befindet sich das von der Aderhaut abpräparierte und nach oben geklappte Sklera-Läppchen. Alle drei Bulbusschichten - Sklera, Choroidea und Retina - sind deutlich erkennbar und erscheinen geordnet, es zeigen sich keine größeren Läsionen oder Einrisse, die Struktur der Bulbuswand ist vollständig erhalten. Des Weiteren ergeben sich keine Hinweise auf ausgeprägte Blutungen, eine Verdrängung von Gewebe oder starke Deformierung der Strukturen durch auffällige größere extravaskuläre Erythrozyten-Ansammlungen hat nicht stattgefunden. Lediglich am Sklera-Deckel und in den Abschnitten, die an den behandelten Bereich direkt angrenzen, findet man kleinere, nach peripher abnehmende Blutungen zwischen Sklera und Choroidea, vermutlich bedingt durch die Vorgänge beim Abpräparieren des skleralen Läppchens. Die Architektur des Gewebes insgesamt ist also weitgehend erhalten (vgl. auch Abb. 3.7.).

3.1.2. Spezielle Betrachtung der Aderhaut

Nun soll das Augenmerk auf die mittlere Bulbusschicht, die Aderhaut, gerichtet werden. Insgesamt ist auch diese über den ganzen dargestellten Bereich hinweg - einschließlich dem mit der Radiofrequenz-Methode behandelten Abschnitt - intakt,

d.h. es werden keine Läsionen, Zerreißen oder Ähnliches beobachtet, in keinem Bereich wurde die Choroidea stark beschädigt oder zerstört. Abb.3.7. zeigt einen Ausschnitt aus dem behandelten Aderhaut-Bereich.

Dennoch hat sich das Erscheinungsbild der Aderhaut als Ganzes gewandelt. Es finden sich zahlreiche auffällige Veränderungen, die sowohl die Struktur des Bindegewebes, als auch der darin eingebetteten Gefäße betreffen. Dies soll im Folgenden genauer untersucht werden.

a) Veränderungen des choroidalen Bindegewebes

Bei der mikroskopischen Betrachtung des Bindegewebes einer unbehandelten Choroidea eines gesunden Landschweins (vgl. Abb. 3.1.), lassen sich locker verteilte kollagene Fasern erkennen, die zusammen mit den dazwischen liegenden Fibrozyten und zahlreichen dunkel gefärbten Melanozyten ein lockeres Bindegewebe formen.

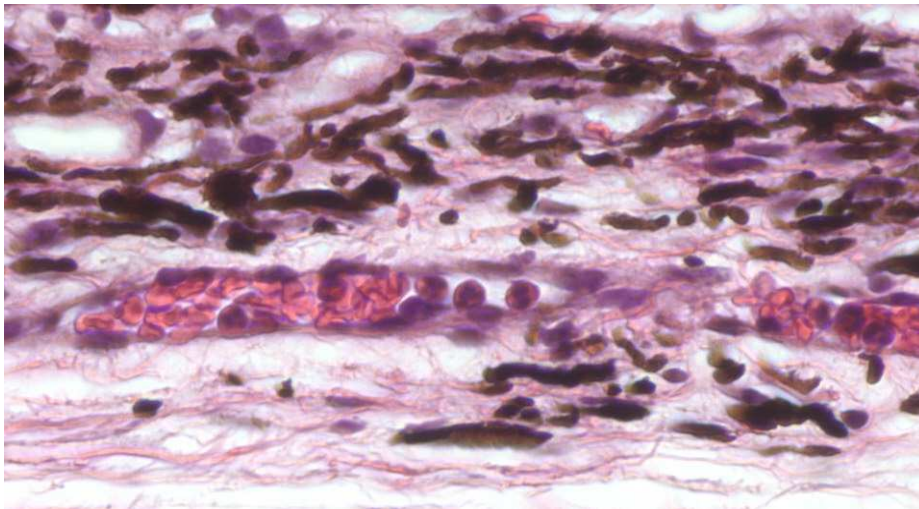


Abb. 3.1. Mikroskopischer Ausschnitt aus dem Bindegewebe einer unbehandelten Aderhaut. Die locker verteilten kollagenen Fasern sind zartrosa gefärbt, dazwischen liegen Fibrozyten und zahlreiche verzweigte Melanozyten, welche an ihrer auffälligen dunklen Färbung erkennbar sind; die amorphe Grundsubstanz erscheint ungefärbt und hell. In dieses lockere choroidale Bindegewebe sind die Gefäße der Aderhaut eingebettet.

Im Vergleich hierzu weist das Bindegewebe der Aderhaut, die mit der “Fulguration“-Form des Radiofrequenz-Verfahrens bearbeitet wurde, deutliche Veränderungen auf: Die Struktur erscheint insgesamt stark verdichtet. Im Präparat sind kaum noch ungefärbte Bindegewebs-Bereiche zu sehen, die weiten Räume mit amorpher Grundsubstanz, durch welche die kollagenen Fasern normalerweise getrennt werden, scheinen also nicht mehr vorhanden zu sein. Die Verdichtung des Gewebes lässt keine Unterscheidung der einzelnen kollagenen Fasern voneinander zu, die sonst so zarten Fasern sind nicht mehr erkennbar, sondern dicke Stränge verdichteten Gewebes dominieren zum Teil das Bild. Der Eindruck eines “lockeren” Bindegewebes wie in Abb. 3.1. ist verschwunden.

In Abb. 3.2. sind die Veränderungen des choroidalen Bindegewebes dargestellt.

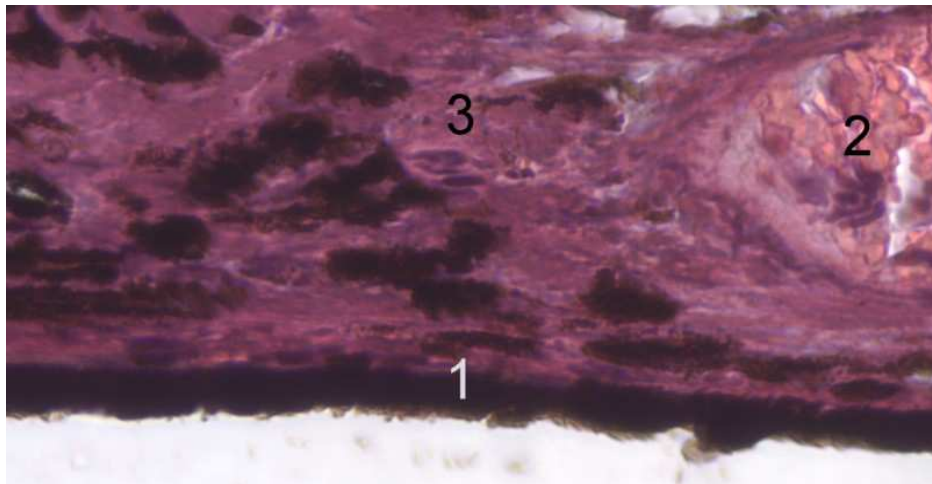


Abb. 3.2. Vergrößerter Ausschnitt aus dem Bindegewebe des mit der Radiodiathermie-Methode behandelten Bereiches der Choroidea. Unten erkennt man das von den übrigen Netzhautschichten abgelöste retinale Pigmentepithel (1), rechts im Bild ist ein Teil eines Gefäßes zu sehen, in dem sich vermehrt Erythrozyten befinden (2). Das Bindegewebe (3) weist eine starke Verdichtung auf, einzelne kollagene Fasern und ungefärbte Bereiche amorpher Grundsubstanz sind nicht zu erkennen.

b) Veränderungen an den Gefäßen

Im Anschluss an das Bindegewebe der Aderhaut sollen nun die darin eingebetteten Gefäße genauer betrachtet werden. Zur besseren Darstellung der Auswirkungen der Radiofrequenz-Anwendung auf die choroidalen Gefäße ist in Abb. 3.3. zum Vergleich ein unbehandelter Aderhaut-Ausschnitt eines Landschweins aufgeführt. Das Bild zeigt zahlreiche Gefäßanschnitte.

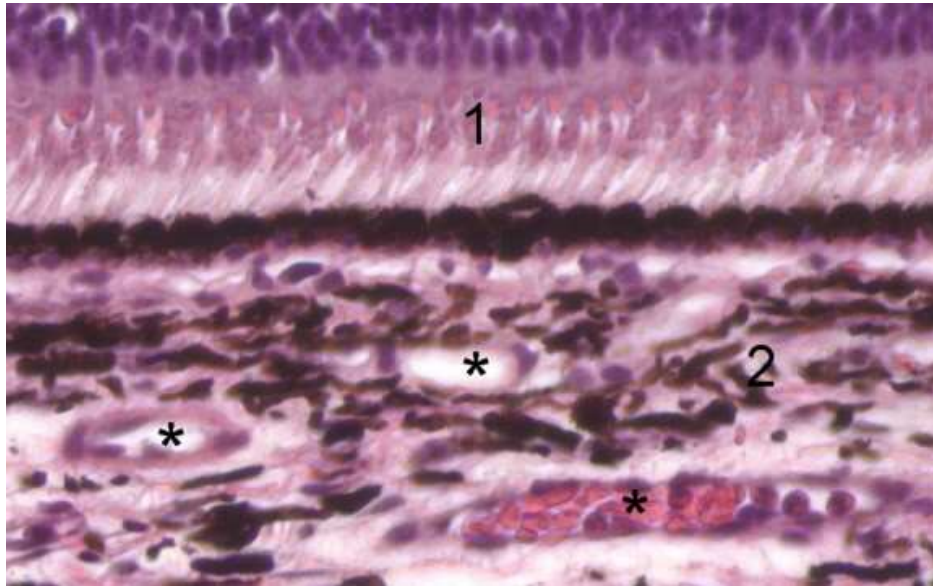


Abb. 3.3. Mikroskopischer Ausschnitt aus der Bulbuswand eines unbehandelten Schweine-Auges. Oben ist ein Teil der Netzhaut (1) zu sehen, in der darunter liegenden Choroidea (2) sind einige Gefäßanschnitte mit Stern (*) gekennzeichnet.

Wie bereits erwähnt, findet man im Gewebe des operierten Auges keine größeren extravaskulären Erythrozytenansammlungen, eine ausgeprägte Blutung scheint die Behandlung also nicht hervorgerufen zu haben.

Untersucht man daher das Präparat zunächst auf die Intaktheit der choroidalen Gefäße, so ist festzustellen, dass nirgends eine Gefäßarrosion stattgefunden hat. In keinem Bereich lassen sich Anschnitte von beschädigten oder zerstörten Arteriolen oder Kapillaren finden. Die Gefäßwände sind gut erhalten und wurden durch die Behandlung nicht destruiert.

Dennoch: Trotz der insgesamt bewahrten Intaktheit der Aderhaut-Gefäße hat sich deren Morphologie auffällig verändert.

Betrachtet man als erstes die Gefäße des unmittelbar mittels Radiodiathermie bearbeiteten Aderhaut-Abschnittes (mit abpräparierter Sklera), fällt sofort eine starke Dilatation ins Auge. Im Vergleich mit der durchschnittlichen Weite eines normalen choroidalen Gefäßes (Abb. 3.3.) hat sich der Gefäß-Durchmesser im behandelten Gewebe teilweise um ein Mehrfaches vergrößert. Wie in Abb. 3.4. deutlich erkennbar, ist die Gefäßektasie teils so ausgeprägt, dass sich die Arteriolen über die Ebene des choroidalen Bindegewebes hinauswölben. Eine noch viel stärkere Gefäßdilatation zeigt sich im Übergangsbereich, d. h. in den Abschnitten, die an den mit Radiofrequenz-Wellen behandelten Choroidea-Bereich direkt angrenzen, selbst aber eine intakte Sklera aufweisen (vgl. Abb. 3.5.). Die Kalibervergrößerung tritt hier besonders deutlich zu Tage; die Gefäßerweiterung ist massiv und übertrifft die aus dem direkt behandelten Aderhaut-Abschnitt. Insgesamt nimmt die Dilatation der Gefäße zu den Randbereichen hin zu.

Neben dem vergrößerten Durchmesser ist auch der deutlich veränderte Inhalt der Gefäße auffällig. Zwar findet man aufgrund der nicht vorhandenen Gefäßarrosion keine sehr großen extravaskulären Erythrozyten-Ansammlungen, intravaskulär jedoch sind die roten Blutzellen extrem vermehrt. So kommt zur verstärkten Gefäßdilatation eine massive Hyperämie hinzu. Vor allem in den stark geweiteten Arteriolen des Übergangsbereiches (Abb. 3.5.) lässt sich dies besonders gut beobachten: Das Lumen erscheint angefüllt von einer großen Menge an roten Blutkörperchen - die einzelnen Erythrozyten sind an ihrer rundlichen Form und roten Färbung erkennbar.

Im Gegensatz dazu finden sich in den Gefäßanschnitten der gesunden unbehandelten Aderhaut kaum bzw. nur sehr wenige Blutzellen. Im Vergleich mit Abb. 3.3. wird die starke Hyperämie der Gefäße des Übergangsbereiches deutlich.

Ein etwas anderes Bild bezüglich des Gefäßinhaltes zeigt sich im mittleren Bereich des Präparates, also dort, wo die Choroidea direkt mit der Radiofrequenz-Methode bearbeitet wurde (Abb. 3.4.). Viele der erweiterten Gefäßlumina sind hier komplett ausgefüllt mit einer verdickt erscheinenden Gewebemasse, die eine verstärkte rote Färbung aufweist. Während in den hyperämischen Arteriolen des Übergangsbereiches in der großen Erythrozytenmenge jedes Blutkörperchen einzeln erkennbar ist, lässt sich beim Gefäßinhalt des direkt bearbeiteten Bereiches nur noch bei stark

vergrößerter Untersuchung des Objektträgers nur teilweise erahnen, dass sich Erythrozyten in der verdickten Masse befinden. Die roten Blutkörperchen erwecken den Eindruck, als seien sie miteinander “verschmolzen” oder “verbacken”. Dies ist auch dadurch bedingt, dass sich innerhalb der Gefäßlumina zwischen den Blutzellen keine ungefärbten Bereiche mehr befinden, was in den Gefäßen des Übergangsbereiches noch der Fall ist; somit erscheinen die Gefäße prall gefüllt mit einer verdickten Amyloid-ähnlich aussehenden Gewebemasse.

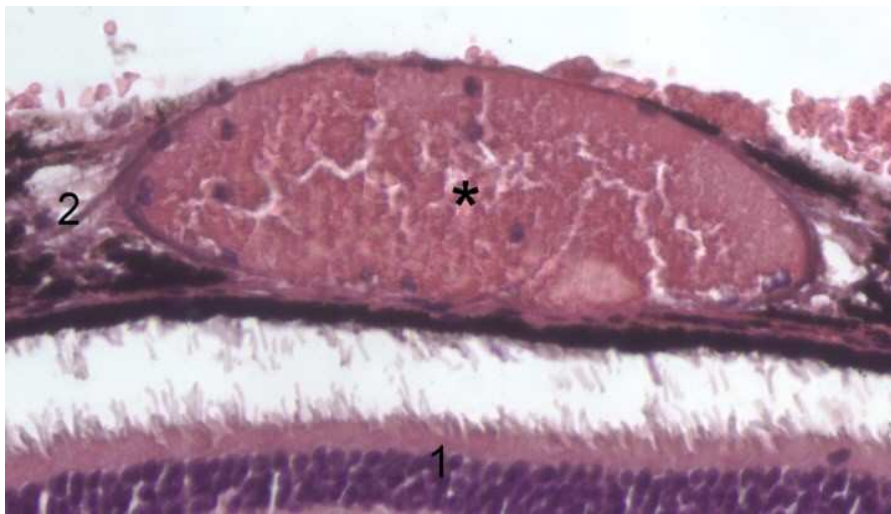


Abb. 3.4. Vergrößerter Ausschnitt des behandelten Aderhaut-Bereiches. Unten ein Teil der Retina (1); die Gefäße (*) der Aderhaut (2) sind insgesamt intakt, aber auffällig verändert. Die Gefäßwände sind zwar nicht arrodiiert, doch zeigt sich eine starke Dilatation. Das erweiterte Gefäßlumen ist ausgefüllt mit einer verdickten, stark gefärbten Gewebemasse, einzelne Erythrozyten sind nicht bzw. nur schwer erkennbar. Das prall gefüllte Gefäß wölbt sich über die Ebene des Aderhaut-Bindegewebes hinaus.

Eine weitere Veränderung im Gefäßinhalt zeigt sich außerdem vermehrt in den Arteriolen des Übergangsbereiches (Abb.3.5.). Neben der enormen Anzahl rot gefärbter Erythrozyten findet man im Lumen der Gefäßanschnitte - bevorzugt in Nähe der Gefäßwände - Bereiche, die ein homogenes Aussehen und eine zartrosa Färbung aufweisen. Sie haben engen Kontakt zum Wandendothel und scheinen an manchen Stellen teils Fäden-artig mit diesem verbunden. Vermutlich handelt es sich dabei um

intravaskuläres Fibrin. Auch die Erythrozyten stehen mit diesem in enger Verbindung. Abb. 3.5. zeigt im linken Gefäßanschnitt sehr deutlich das mit der Gefäßwand verbundene Fibrin.

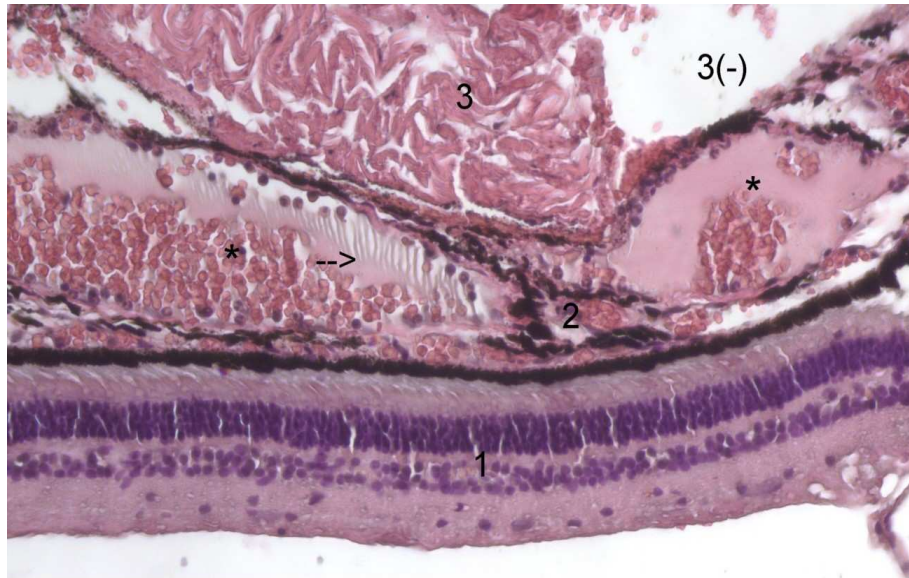


Abb. 3.5. Übergangsbereich. Unten die Netzhaut (1), darüber die in allen Abschnitten intakte Aderhaut (2), rechts oben ist die Sklera von der Choroidea abpräpariert (3(-)). Der linke Bildteil zeigt das an den behandelten Bereich angrenzende Gewebe, bei dem die Sklera (3) erhalten ist. Die Gefäße (*) des Übergangsbereiches sind massiv dilatiert und hyperämisch. Im Lumen erkennt man vermehrt Erythrozyten, daneben homogene Bereiche zartrosa Fibrins, welches sich vor allem in der Nähe der Gefäßwand befindet. Die teils Fäden-artige Verbindung (siehe Pfeil) zum Endothel ist im linken Gefäßanschnitt deutlich erkennbar.

3.1.3. Weitere Auffälligkeiten

Bei der Untersuchung der Präparate auf weitere Gewebeveränderungen außerhalb der Choroidea, die durch die Radiofrequenz-Behandlung möglicherweise hervorgerufen wurden, ergeben sich nur wenig Auffälligkeiten.

Erwähnenswert ist hierbei eine Abhebung der Netzhaut vom retinalen Stratum

pigmentosum, welche auf den direkt bearbeiteten Bereich, an dem das Skleralälppchen abpräpariert wurde, beschränkt ist. In einem kleinen Teilbereich erkennt man zwischen den Dissektionsrändern, die ein ausgefranztes Aussehen aufweisen, eine leichte Blutung. Die übrigen Netzhautschichten sind weitestgehend intakt und zum allergrößten Teil gut erhalten (vgl. Abb. 3.7. und Abb. 3.5.).

Ansonsten ergeben sich - wie schon in Punkt 3.1.1. erwähnt - keine Hinweise auf ausgeprägte Gewebedestruktionen oder Koagulationsnekrosen; ebenso lassen sich keine Rückschlüsse auf größere Blutungen ziehen.

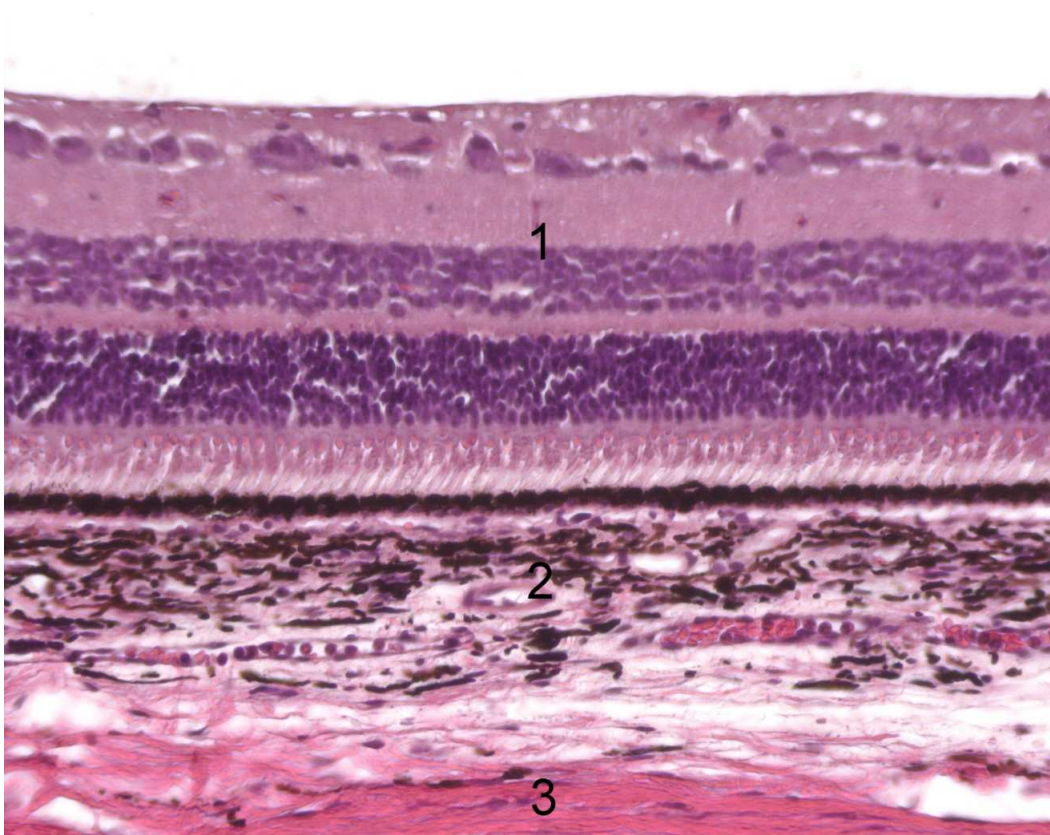


Abb. 3.6. Überblick: Mikroskopischer Ausschnitt aus der Bulbuswand eines gesunden Landschweins. Im Bild oben befindet sich die Retina (1), darunter die Choroidea (2); im Melanozyten-reichen choroidalen Bindegewebe sind zahlreiche Gefäßanschnitte zu erkennen. Unten sieht man einen Teil der Sklera (3), aus der kollagene Fasern in die Lamina suprachoroidea einstrahlen.

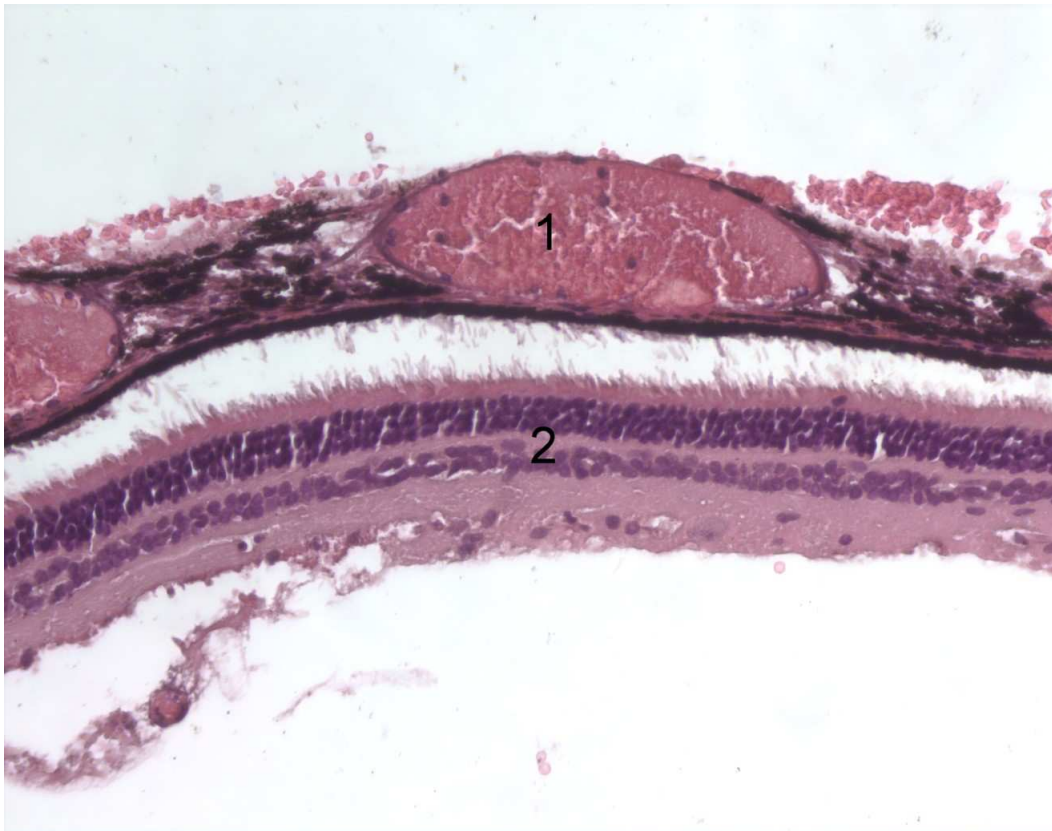


Abb. 3.7. Überblick: Mikroskopischer Ausschnitt aus dem mit der Radiofrequenz-Methode behandelten Wandbereich. Oben die Aderhaut (1), die eigentlich darüber liegende Suprachorioidea und Sklera sind abpräpariert. Darunter erkennt man die verschiedenen Schichten der Netzhaut (2), die Photorezeptorenschicht hat sich vom retinalen Pigmentepithel gelöst. Die Aderhaut ist insgesamt intakt, ihr Aussehen hat sich durch die Radiofrequenzbehandlung aber deutlich gewandelt. Sowohl das choroidale Bindegewebe als auch die darin eingebetteten Gefäße zeigen Veränderungen.

3.1.4. Zusammenfassung

Resümierend lässt sich bei der histopathologischen Untersuchung des mit Hämalaun-Eosin gefärbten Übersichtspräparates Folgendes festhalten:

1. Die Architektur des Gewebes insgesamt ist vollständig erhalten - alle drei Bulbusschichten einschließlich der mit Radiofrequenzwellen bearbeiteten Aderhaut sind zum allergrößten Teil intakt.
2. Es ergeben sich keinerlei Hinweise auf ausgeprägte Blutungen und es hat keine Arrosion choroidaler Gefäße stattgefunden.
3. Das Erscheinungsbild der Aderhaut selbst hat sich durch die Behandlung jedoch verändert. Das betrifft sowohl das choroidale Bindegewebe, bei dem der Eindruck eines lockeren Gewebes verloren gegangen ist, als auch die darin eingebetteten Gefäße. Diese sind - vor allem im Übergangsbereich - massiv dilatiert und hyperämisch. Intraluminal erkennt man teilweise intravaskuläres Fibrin; die Gefäße des direkt bearbeiteten Bereiches erscheinen prall gefüllt mit einer verdickten amorphen Gewebemasse.

3.2. Auswertung des TUNEL-Tests

Im Anschluss an die Untersuchung des mit Hämalaun-Eosin gefärbten Schnittes auf Gewebeveränderungen, welche auf die Radiofrequenzwellen zurückzuführen sind, werden nun die immunhistochemisch behandelten Objektträger genauer betrachtet. Beim durchgeführten TUNEL-Test soll in dem mit der "Fulguration-Form" behandelten Aderhautgewebe speziell nach apoptotischen Zellen gesucht werden.

3.2.1. Untersuchung der Positiv-Kontrolle

Zuerst wird das mit DNase inkubierte Gewebe untersucht. Die durch dieses Enzym entstandenen freien 3'OH-Enden der DNS-Spaltprodukte (welche auch im Falle eines apoptotischen Zellgeschehens entstehen) wurden in den weiteren Reaktionen detektiert und sichtbar gemacht. Somit ergibt sich das Bild eines positiven TUNEL-Tests. Abb. 3.8. zeigt einen mikroskopischen Ausschnitt aus der mit DNase bearbeiteten Positivkontrolle. Die Zellen, in denen es zur Bildung von DNS-Fragmenten gekommen ist, zeigen eine charakteristische dunkelrote Färbung, die übrigen Gewebeanteile erscheinen bläulich. Im Bild erkennt man in den Körnerschichten der Netzhaut deutlich sehr viele TUNEL-positive Zellen. Eine solche rötliche Färbung zeigen auch zahlreiche Zellen der Choroidea, und zwar sowohl intraluminal in den Gefäßen, als auch im umgebenden Bindegewebe.

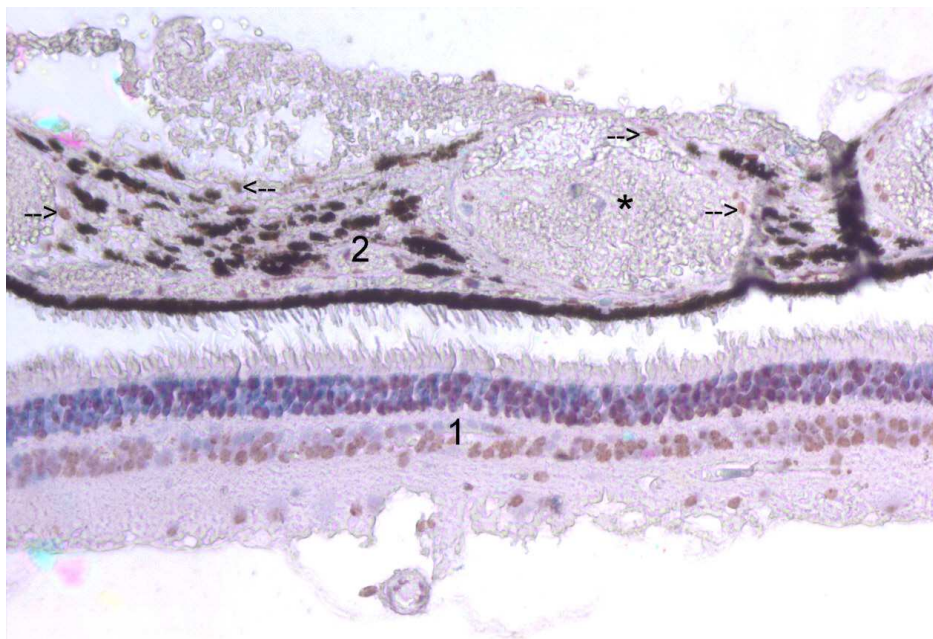


Abb. 3.8. TUNEL-Test: mit DNase inkubierte Positivkontrolle. Unten die Schichten der Retina (1), darüber Aderhaut (2) mit Gefäßanschnitten (*); das retinale Pigmentepithel hat sich von der übrigen Netzhaut abgehoben. In der Choroidea sind einige der zahlreichen TUNEL-positiven dunkelrot gefärbten Zellen mit Pfeil gekennzeichnet; sehr deutlich ist die rötliche Färbung auch in den Körnerschichten der Netzhaut zu erkennen. Die übrigen Gewebestrukturen erscheinen bläulich.

3.2.2. Untersuchung des Test-Präparates

Nun soll mikroskopisch jenes Präparat betrachtet werden, bei dem der TUNEL-Test – wie in Punkt 2.3.2. (vgl. Tab. 2.2.) beschrieben – regelrecht ausgeführt wurde.

Schon auf den ersten Blick fällt auf, dass rötliche Zellfärbungen deutlich geringer ausgeprägt bzw. fast nicht vorhanden sind. Die Körnerschichten der Netzhaut zeigen eine teils tiefblaue Färbung, und auch in der Aderhaut erscheinen sämtliche Gewebeanteile - bis auf die dunkel gefärbten Melanozyten im choroidalen Bindegewebe - bläulich; Hinweise auf dunkelrote apoptotische Zellen finden sich kaum. Einen Überblick über das Test-Präparat zeigt Abb. 3.9.

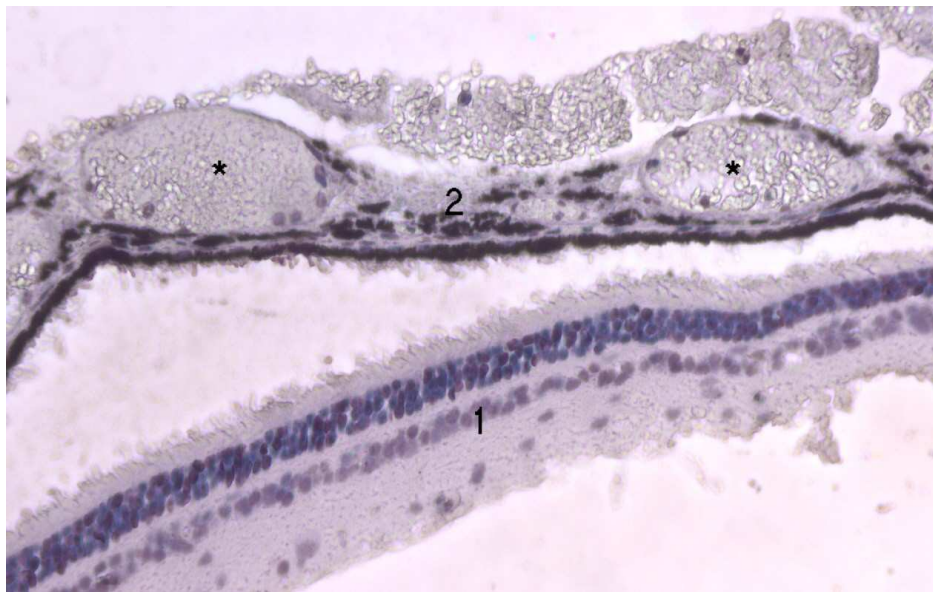


Abb. 3.9. TUNEL-Test: Test-Präparat. Die Zellen der Körnerschichten der Retina (1) zeigen eine blaue bis tiefblaue Färbung. Auch die darüber liegende Choroidea (2), in der zwei Gefäße (*) angeschnitten sind, erscheint durchwegs bläulich; typische dunkelrote apoptotische Zellen sind nicht zu erkennen. Das retinale Pigmentepithel hat sich von den übrigen Netzhautschichten abgehoben.

3.2.3. Vergleich und Zusammenfassung des Testergebnisses

Im Anschluss an die Untersuchung der Positivkontrolle und des Testpräparates im Überblick sollen abschließend beide Objekte noch einmal in vergrößerter Darstellung vergleichend betrachtet werden. Die Abbildungen 3.10. und 3.11. zeigen jeweils einen vergrößerten Ausschnitt aus der Aderhaut, die mit der Radiodiathermie

bearbeitet und dem TUNEL-Test unterzogen wurde. Oben ist die mit DNase bearbeitete Positivkontrolle gezeigt, auf der unteren Abbildung erkennt man das Test-Präparat. Auf beiden mikroskopisch

vergrößerten Ausschnitten ist ein Aderhaut-Gefäß (*) angeschnitten, in der Peripherie liegt das choroidale Bindegewebe. Betrachtet man zunächst den Inhalt der Gefäße, so findet man in beiden Präparaten zum allergrößten Teil eine hellblau gefärbte Gewebemasse - die in Punkt 3.1.2. beschriebenen

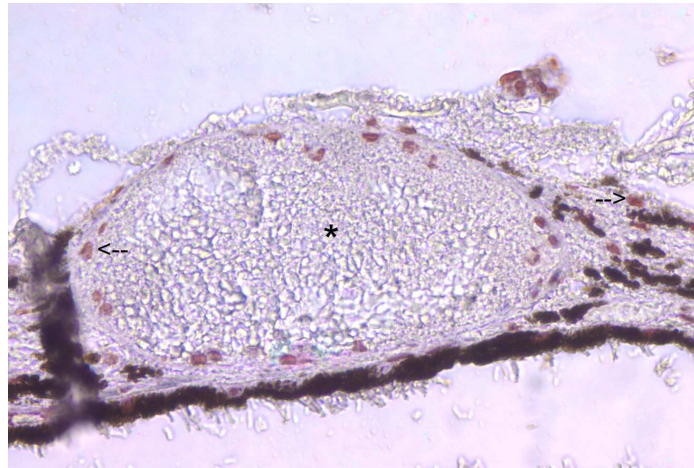


Abb. 3.10. Positivkontrolle: vergrößerter Ausschnitt der Aderhaut aus dem mit DNase bearbeiteten Präparat

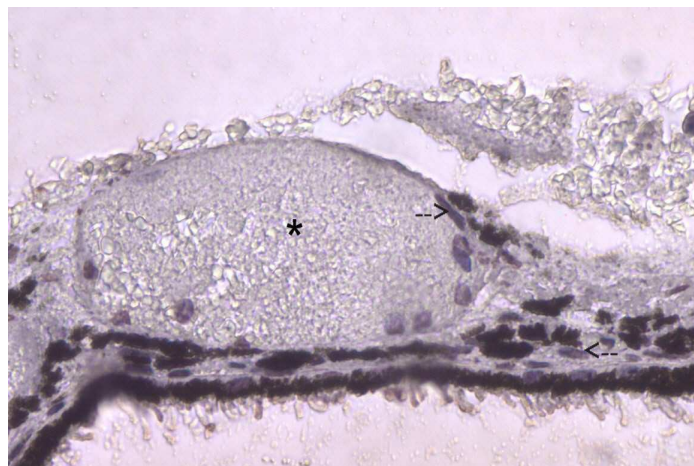


Abb. 3.11. Test-Präparat: vergrößerter Ausschnitt aus der mit Radiodiathermie behandelten Aderhaut

“miteinander verbackenen” Erythrozyten. Während man jedoch in den Gefäßen der Positivkontrolle vor allem in Gefäßwandnähe zusätzlich noch zahlreiche dunkelrot gefärbte Zellen erkennen kann - und zwar zum einen Leukozyten, zum anderen Endothelzellen, deren DNS durch die zugegebene DNase fragmentiert und so detektiert wurde - zeigen die entsprechenden Zellen in der unteren Abbildung eine

dunkle Blaufärbung; im Bereich der Gefäße und Gefäßwände ergeben sich also keine Hinweise auf eine durch die Radiofrequenz-Behandlung hervorgerufene Apoptose. Ein ähnliches Bild ergibt sich auch bei der Untersuchung des die Gefäße umgebenden Bindegewebes. Zwischen den hellblau gefärbten kollagenen Fasern und den dunkel erscheinenden Melanozyten in Abb. 3.10. befinden sich auch hier zahlreiche TUNEL-positive rötliche Bindegewebszellen (Typische positive Zellen - intraluminal und im choroidalen Bindegewebe - sind in dieser Abbildung mit Pfeilen gekennzeichnet). Im Vergleich dazu lassen sich im unteren Bild neben den erwähnten Bindegewebsstrukturen keine dunkelrot gefärbten Zellen erkennen; die langlezogenen Kerne einiger Fibrozyten zeigen in Abb. 3.11. - ähnlich wie die erwähnten intraluminalen Zellstrukturen des Test-Präparates - eine dunkelblaue Färbung (Als Beispiel hierfür sind im Bild intraluminal ein Endothelzell- und im Bindegewebe ein Fibrozyten-Kern mit Pfeil hervorgehoben).

Ingesamt lassen sich all diese Beobachtungen zu folgendem Testergebnis zusammenfassen:

Die richtige Durchführung und Funktion des Tests zeigt sich an den zahlreich erkennbaren TUNEL-positiven rötlichen Zellen der mit DNase inkubierten Positivkontrolle (vgl. Abb. 3.8. und 3.10.). Derartig gefärbte Zellstrukturen finden sich in der zusätzlich angefertigten Negativkontrolle nicht.

Ebenso wenig lassen sich diese im Testpräparat erkennen (vgl. Abb. 3.9. und 3.11.). In der mit dem Radiofrequenz-Verfahren behandelten Aderhaut zeigen sich also - weder im Bereich der Gefäße noch im choroidalen Bindegewebe - vermehrt in Apoptose befindliche Zellen.

3.3. Evaluierung der erforderlichen Geräteparameter

Um dem Ziel der experimentellen Erprobung des Radiodiathermie-Verfahrens an der Aderhaut möglichst nahe zu kommen, nämlich eine Blutung bei der transchorioidalen Penetration effektiv zu verhindern, dabei jedoch geringstmögliche Kollateralschäden zu verursachen, mussten die Geräte-Einstellungen exakt evaluiert werden.

Erst nach genauer Festlegung der erforderlichen Parameter, konnten Ergebnisse, wie sie in den Punkten 3.1. und 3.2. beschrieben sind, erzielt werden. Die Abbildungen 3.12. und 3.13. sollen beispielhaft die Notwendigkeit dieser Evaluierung veranschaulichen.

Beide Bilder stellen mit Hämalaun-Eosin angefärbte mikroskopische Schnitte der Choroidea zweier Hausschweine dar, welche ebenfalls mit der Radiofrequenz-Methode – jedoch

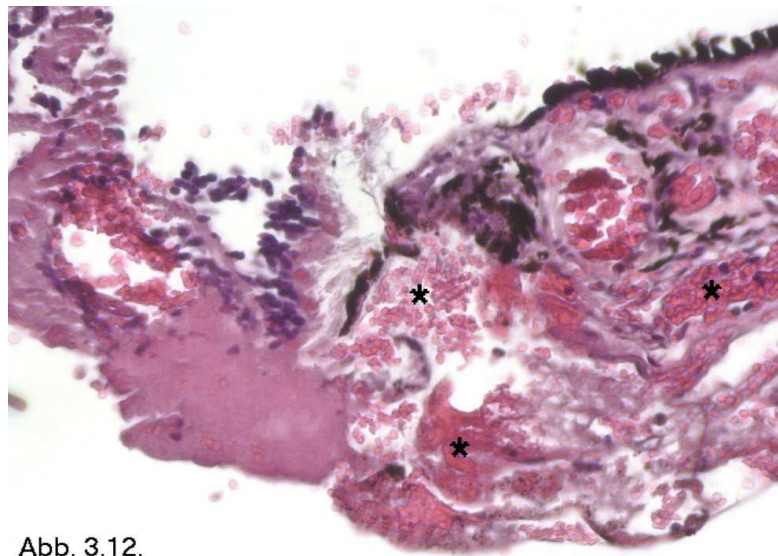


Abb. 3.12.

anderen Geräteeinstellungen (vgl. 2.2.2.) – behandelt wurden. Im Vergleich mit den zuvor beschriebenen Präparaten treten deutliche Unterschiede zu Tage, von denen hier nur exemplarisch einige kurz genannt werden sollen:

Neben der insgesamt stark beeinträchtigten Intaktheit des Gewebes und der veränderten Architektur, lassen die an vielen Stellen frei im Stroma befindlichen Erythrozyten (in Abb. 3.12. mit Stern gekennzeichnet) auf stattgefundene Gefäßarrosionen mit nachfolgenden Blutungen schließen. In Abb. 3.13. hat die Aderhaut vor allem an dem im oberen Bildteil befindlichen Abschnitt an Höhe abgenommen, unten zeigen sich Läsionen und Einrisse (Pfeil). Durch die Blutungen und Risse wurde die Choroidea stark deformiert. Die Netzhaut wurde in beiden Präparaten entfernt, das dunkler gefärbte retinale Pigmentepithel ist zum größten Teil erhalten.

Insgesamt wird also deutlich, dass bei der Radiofrequenz-Behandlung der Aderhaut die Ergebnisse mit veränderten Geräteeinstellungen variieren. Bei der Wahl schlechter geeigneter Parameter sind



Abb. 3.13.

mögliche Kollateralschäden stärker ausgeprägt und ein zufrieden stellendes chirurgisches Vorgehen ist nicht mehr in vollem Maße möglich.

3.4. Vergleichende Betrachtung des mit dem Diodenlaser bearbeiteten Präparates

Wie bereits erwähnt – prinzipiell ist zur Verhinderung einer Blutung auch der Einsatz anderer Verfahren möglich.

Abb. 3.14. zeigt einen mikroskopischen Ausschnitt aus der mit dem **Diodenlaser** (vgl. 2.1.2.) behandelten Bulbuswand eines Landschweines. Schon in der Übersichtsfärbung mit Hämalaun-Eosin kann man Unterschiede zu den vorher beschriebenen Präparaten feststellen. Das Gewebe wurde zu einem beträchtlichen Maße geschädigt, was vor allem auch die Netzhaut (1) betrifft, die einen Großteil ihrer Intaktheit verloren hat. An den retinalen Schichten zeigen sich vermehrt Einrisse und Läsionen und am oberen Bildrand finden sich als Ausdruck einer möglichen retinalen Blutung freie Erythrozytenansammlungen (*). Insgesamt lässt sich eine vergleichsweise stärker ausgeprägte Gewebedestruktion feststellen. Die darunter liegende Aderhaut (2) ist davon weniger betroffen, nur an wenigen Stellen erkennt man bei ansonsten meist erhaltener Integrität vereinzelt kleine Blutungen (Pfeil).

Auch die Auswertung des an diesen Präparaten ebenfalls durchgeführten TUNEL-Tests fällt anders aus als bisher beobachtet:

Auffällig sind die in allen Bereichen des Gewebes zahlreich vorhandenen dunkelrot gefärbten Zellen. Diese TUNEL-positiven Zellstrukturen lassen sich – einer mit DNase inkubierten Positivkontrolle ähnlich – im gesamten Präparat durchgehend in großer Anzahl (vgl. Abb. 3.15.) nachweisen, sowohl in den Schichten der (zusätzlich lädierten) Netzhaut (1), als auch in der darunter liegenden Aderhaut (2). Die Vielzahl solcher apoptischer, d.h. in den programmierten Tod eingetretener Zellen, weist also eine Gewebeschädigung nach, welche auf die Anwendung des Diodenlasers zurückzuführen ist.

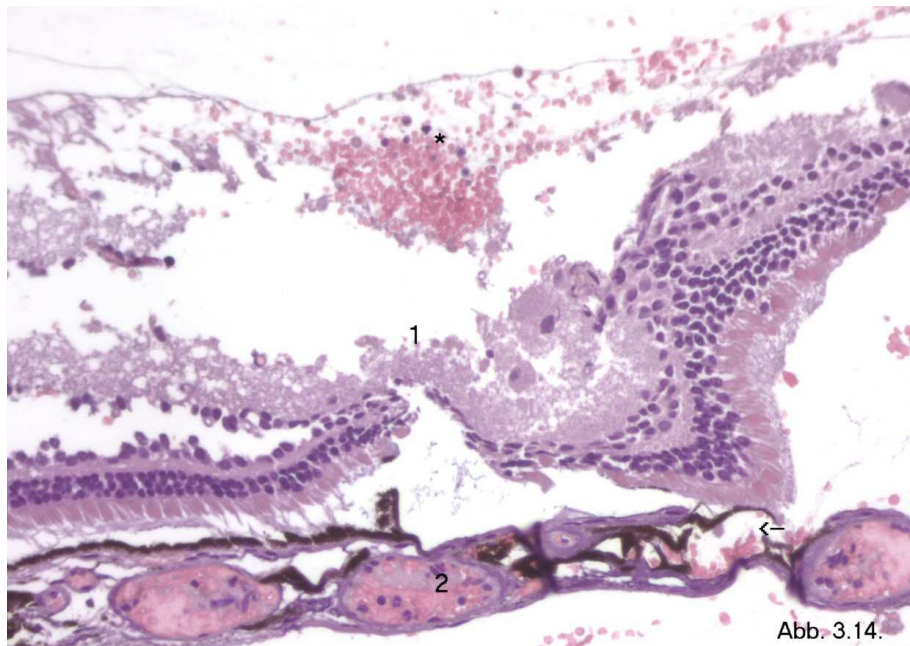


Abb. 3.14. Mit dem Diodenlaser behandeltes Präparat der Bulbuswand (Hämalaun-Eosin-Färbung)

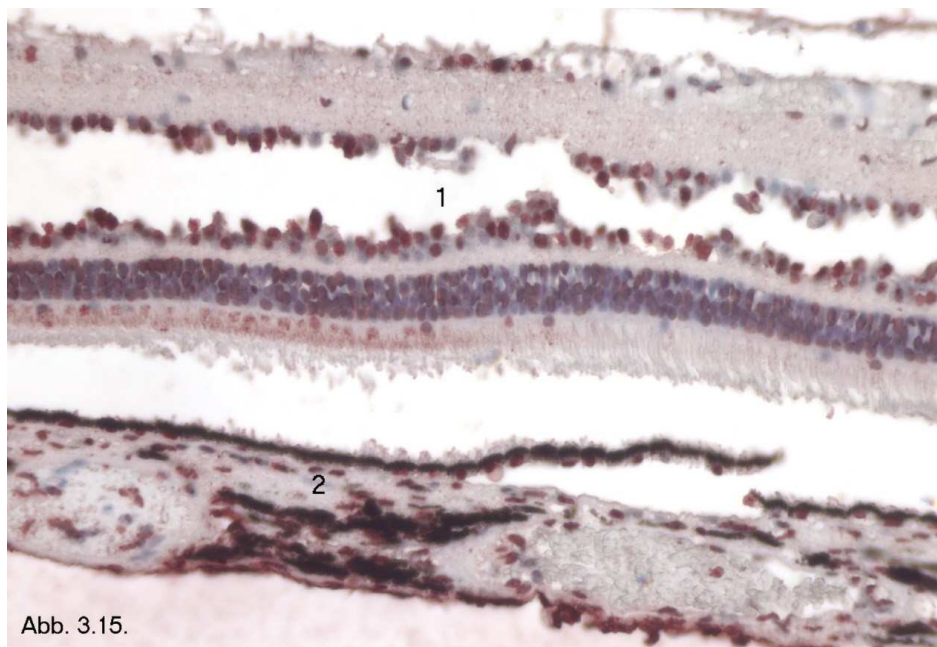


Abb. 3.15. TUNEL-Test des mit dem Diodenlaser bearbeiteten Bulbuswand-Präparates

Um den Unterschied zwischen der Anwendung der Radiodiathermie einerseits und des Diodenlasers andererseits in ihrer Wirkung auf die Aderhaut noch zu

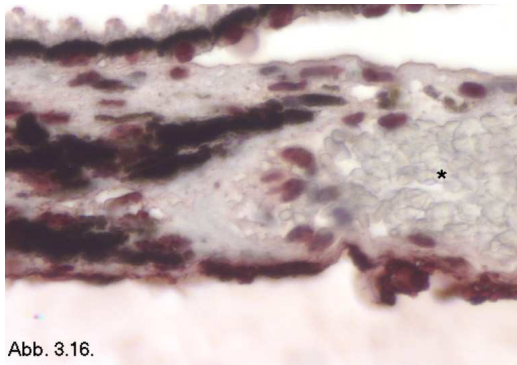


Abb. 3.16.

verdeutlichen, sind in den Abb. 3.16. und 3.17. zwei vergrößerte Ausschnitte der jeweiligen TUNEL-Test-Präparate dargestellt.

Auf beiden Abbildungen ist jeweils ein Ausschnitt aus der bearbeiteten Choroidea gezeigt; die Gefäßanschnitte sind mit Stern

gekennzeichnet. Während man in der mit dem Diodenlaser behandelten Aderhaut (Abb. 3.16.) sowohl intraluminal im Gefäß, vor allem aber auch im umgebenden Bindegewebe enorm viele typisch rot gefärbte apoptotische Zellen findet, zeigen die entsprechenden Zellstrukturen in dem Präparat, bei dem das Radiowellen-Verfahren angewandt wurde (Abb. 3.17.), eine blaue Färbung.

Aufgrund der vermehrt nachgewiesenen in Apoptose befindlichen Zellen lässt sich also festhalten, dass das

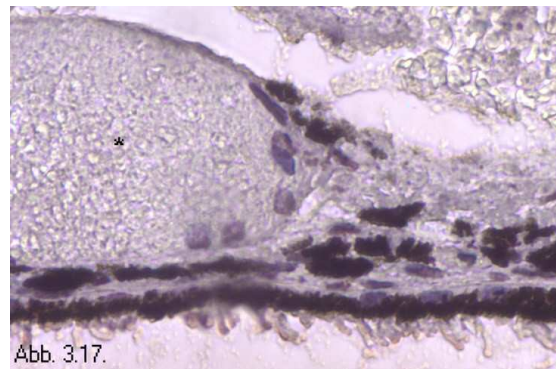


Abb. 3.17.

Laserverfahren im Vergleich zur Radiodiathermie in diesem Fall eine deutlich schädigendere Wirkung auf das behandelte Gewebe hatte.

4 DISKUSSION

4.1. Bewertung der Ergebnisse

Die histologischen Korrelate der Anwendung der Radiowellen-Technologie an der Aderhaut wurden ausführlich dargestellt. Wie diese Beobachtungen möglicherweise zu Stande gekommen sind, welche Bedeutung ihnen beigemessen werden kann, dies soll nun anschließend im Folgenden diskutiert werden.

4.1.1. Histopathologische Bedeutung der Untersuchungsergebnisse des mit Hämalaun-Eosin gefärbten Präparates

Die Folgen der Radiodiathermie auf die operative Praxis entsprachen durchwegs den erwünschten Anforderungen: Bei der im Anschluss an die Anwendung durchgeführten kleinen transchorioidalen Inzision zeigte sich – wie bereits in Punkt 2.3.1. erwähnt – keinerlei Blutung.

Welche Bedeutung haben nun die histopathologischen Ergebnisse?

Von großem Vorteil ist zunächst die fast vollständig erhaltene Gewebearchitektur des bearbeiteten Bulbusabschnittes: Weder Aderhaut (wenn auch das Erscheinungsbild insgesamt Veränderungen zeigt) noch Netzhaut (und dies ist wichtig auch im Hinblick auf die spätere Funktion eines subretinalen Chips) wurden durch die Bearbeitung lädiert oder gar zerstört; alle Bulbusschichten sind in ihrer Gesamtheit erhalten, was für die Qualität des Radiodiathermie-Verfahrens spricht. Nicht vorhandene größere extravaskuläre Erythrozyten-Ansammlungen und die intakten choroidalen Gefäße bestätigen die praktische Erfahrung bei der OP, dass eine Blutung bei der Penetration der Aderhaut nicht stattgefunden hat.

Über das Zustandekommen des trotz allem morphologisch veränderten Bildes der (insgesamt aber erhaltenen) Choroidea lassen sich Vermutungen anstellen, wenn man sich noch einmal die Wirkweise des Radiofrequenz-Verfahrens vergegenwärtigt (vgl.

Punkt 2.2.): Das zu behandelnde Gewebe heizt sich beim Durchtritt der Radiowellen auf und wird dehydriert, zusätzlich kommt es in Abhängigkeit von Elektrodenform und Intensität der Wellen zur Koagulation und damit zur Hämostase.

So ist die starke Verdichtung des eigentlich lockeren **Bindegewebes** der behandelten Aderhaut wahrscheinlich Ausdruck dieser Dehydratation; die zwischen den kollagenen Fasern befindlichen weiten Räume amorpher wasserreicher Grundsubstanz sind aufgrund des dehydrierenden Effektes der Radiowellen verschwunden.

Bei der (nach vorher erfolgter Evaluierung verschiedener Geräteparameter) experimentell an diesem Schweineauge angewandten Methode handelt es sich speziell um die “Fulguration“-Form, die Wellenform mit der stärksten lateralen Hitzeentwicklung und extrem dehydrierendem Effekt (siehe 2.2.2.). Mit zunehmender Intensität der Radiowellen steigt auch das Ausmaß der erreichten Koagulation, welche sich im Inhalt der **choroidalen Gefäße** widerspiegelt: Die verdickte Masse “miteinander verschmolzener” Erythrozyten, mit der die Gefäße des direkt bearbeiteten Aderhaut-Bereiches ausgefüllt sind, scheinen das histologische Korrelat der Koagulation und Hitzeinwirkung auf das Gewebe darzustellen. Aber auch das zartrosa Fibrin, welches sich in den Arteriolen des Übergangsbereiches befindet, ist wahrscheinlich durch thermische Aktivierung der Gerinnungskaskade entstanden und trägt zur Koagulation und Hämostase bei.

Auf lokale Hitzeinwirkung reagieren Gefäße physiologischer Weise zunächst mit Weitstellung und Permeabilitätssteigerung – so kommt es z.B. bei leichten Verbrennungen zu Rötungen und Schwellungen der Haut. Auf diese Art lässt sich vermutlich auch die beobachtete Ektasie der Aderhautgefäße erklären; die besonders bei der “Fulguration“-Form der Radiofrequenz-Methode stärker ausgeprägte laterale Hitzeentwicklung scheint somit der Grund zu sein für die massive Gefäßdilatation und Hyperämie, die sich in den choroidalen Gefäßen ausgeprägt darstellen. Vor allem im Übergangsbereich des behandelten Bulbusabschnittes lässt sich dies gut beobachten, während im direkt bearbeiteten Teil das Bild der “verbackenen” Erythrozyten in den koagulierten Gefäßen überwiegt.

4.1.2. Bewertung des TUNEL-Test-Ergebnisses

Mit dem TUNEL-Test wurde versucht zu eruieren, ob und in wie weit die Aderhaut-Behandlung mittels **Radiodiathermie** Schädigungen speziell der choroidalen Zellen hervorgerufen hat. Durch Detektierung gespaltener DNA-Fragmente, welche im Verlauf des mehrstufigen programmierten Zelltodes, der Apoptose, entstehen, sollten untergehende Zellen sichtbar gemacht werden. Bei den angefertigten Positivkontrollen, bei denen erwähnte DNA-Nukleotide künstlich erzeugt worden waren, ist dieser Nachweis auch deutlich gelungen. Die Beobachtung, dass hingegen bei den Testpräparaten weitaus weniger bzw. in großen Teilen fast gar keine derartige apoptotische Zellen zu finden sind, kann ein Hinweis darauf sein, dass die Wirkung der Radiowellen keine allzu großen Schäden an den Aderhaut-Zellen verursacht hat. Durch die Radiodiathermie-Behandlung kam es also offenbar nicht vermehrt zum Eintritt von Zellen in die Apoptose, welche nicht nur im Rahmen des physiologischen Zellunterganges, sondern auch unter krankhaften Bedingungen beispielsweise der Einwirkungen eines schädlichen Agens und auch in der Umgebung von nekrotischen Gewebearealen stattfindet.

Die Ergebnisse des TUNEL-Tests scheinen also zu bestätigen, dass man dem Ziel nahe gekommen ist, bei der Behandlung der Choroidea möglichst wenig Kollateralschäden zu hinterlassen.

4.1.3. Abschließende Betrachtung

Es ist also gelungen, die Auswirkungen der Radiodiathermie-Anwendung an der Aderhaut auch histopathologisch zu beschreiben und nachzuweisen. Über die möglichen Mechanismen des genauen Zustandekommens wurden Vermutungen angestellt.

Eines der Ziele der experimentellen Erprobung dieser Methode war es, trotz einer effektiven Blutungsverhinderung möglichst wenig Schaden am betroffenen Gewebe anzurichten. Dabei sollte neben dem fehlenden Nachweis von vermehrt apoptotischen Aderhautzellen auch noch einmal die erhaltene Intaktheit aller drei Bulbusschichten

hervorgehoben werden. Die Tatsache, dass sich histologisch fast keine Läsionen und Zerstörungen der Gewebearchitektur nachweisen lassen, spricht für die Qualität des Verfahrens.

Die Notwendigkeit der Aderhautpenetration überhaupt ergab sich aus der Bevorzugung des kombinierten Verfahrens für die Implantation eines subretinalen Chips, welches deshalb vorteilhaft ist, weil sich mit ihm ein retinales Trauma aufs Minimale begrenzen lässt. Gerade auch die Schichten der Netzhaut, welche für die Chip-Funktion von großer Bedeutung sind (die Photodioden ersetzen ja nur die zu Grunde gegangenen Photorezeptoren), erschienen bei der histologischen Untersuchung fast durchwegs gut erhalten und unbeschädigt.

Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass Ergebnisse, wie sie in den Punkten 3.1. und 3.2. dargestellt wurden, nicht ohne Weiteres erreicht werden konnten. Dazu war eine exakte Evaluierung der idealen Geräteparameter nötig, da gezeigt werden konnte, dass bei ungünstigen Geräteeinstellungen Gewebeschäden stärker ausgeprägt waren (vgl. 3.3.). Dies konnte man auch bei der Untersuchung der mit dem Diodenlaser bearbeiteten Aderhaut feststellen, bei der eine große Anzahl apoptotischer Zellen nachgewiesen werden konnte (nicht dagegen bei den mit Radiowellen behandelten Präparaten). In diesem Fall hatte die Behandlung der Aderhaut mit dem Diodenlaser eine deutlich stärker ausgeprägte Gewebeschädigung – sowohl die Choroidea als auch die Netzhaut betreffend – zur Folge (vgl. 3.4.).

Ob aber die Anwendung anderer prinzipiell einsetzbarer Verfahren zur unblutigen Aderhaut-Penetration ebenfalls Ergebnisse ähnlicher Qualität erzielen kann und welches sich als günstig erweisen wird, kann hier vorab nicht gesagt werden und bedarf einer eignen genauen vergleichenden Untersuchung.

4.2. Erfolgreiche Anwendung des Radiodiathermie-Verfahrens

4.2.1. Subretinale Chip-Implantation nahezu ohne Blutung

Eines der Hauptziele der experimentellen Erprobung der Radiodiathermie-Methode an der Choroidea, eine unblutige Penetration der Aderhaut, wurde erreicht. Da das Radiofrequenz-Verfahren gerade im Bereich von stark blutendem Gewebe bereits erfolgreich eingesetzt wird, lag es nahe, auf diese Methode zurückzugreifen.

Dennoch hat sich gezeigt, dass zuvor die für die choroidale Anwendung benötigten Parameter genau evaluiert und definiert werden mussten, um die dargestellten Ergebnisse zu erzielen.

Die Experimente, die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegen, haben dazu geführt, dass am Modell wiederholt Chipimplantationen in den Subretinalraum ohne jede Blutung transchorioidal unter Anwendung der Radiodiathermie durchgeführt werden konnten.

Abb. 4.1. zeigt ein erfolgreich eingesetztes Implantat.



Abb. 4.1. Blick auf den aufgeschnittenen rechten Augenbulbus eines Landschweins. Der mit Pfeil gekennzeichnete subretinale Sehchip wurde unter Anwendung der Radiofrequenz-Methode erfolgreich implantiert. Auch retinale Gefäße sind oberhalb des Chips deutlich zu erkennen.

4.2.2. Große Erfolge bereits auf Gebieten der okuloplastischen Chirurgie

Die Idee, das Radiofrequenz-Verfahren überhaupt im Rahmen der unblutigen transchorioidalen Inzision einzusetzen, ist in den guten Ergebnissen, die bereits auf dem Gebiet der okuloplastischen Chirurgie damit erreicht werden konnten, begründet. In Studien, welche im Rahmen von **Blepharoplastien** des oberen Augenlides durchgeführt wurden, konnten Hautinzisionen mit CO₂-Laser und solche, bei denen die Radiofrequenzmethode angewandt wurde, histopathologisch miteinander verglichen werden. Dabei wiesen die nach dem Radiofrequenz-Verfahren behandelten Gewebeschnitte insgesamt etwa 25 % weniger Gewebeschädigungen auf, es wurden weniger thermische Schäden an den Wundrändern beobachtet, die Störung der zellulären Architektur fiel geringer aus¹⁶.

Aber auch bei anderen plastisch-chirurgischen Eingriffen der Ophthalmologie, wie **Augenbrauen-Lifting**, die **Entfernung benigner Tumoren** sämtlicher Arten mit Lokalisation auf den periorbitalen Umgebungsstrukturen (z.B. Tränendrüsen-Tumore, Schwannome, Xanthelasmen u.a.) oder die operative Behandlung der **Ptosis** wird die Radiodiathermie erfolgreich eingesetzt. Die guten Erfolge gerade auch im Bereich von stark vaskularisiertem Gewebe wie die Entfernung von Hämangiomen, legten die experimentelle Erprobung des Radiofrequenzverfahren an der Aderhaut nahe.

4.3. Ausblick

4.3.1. Subretinales Implantat – Zwischenzeitliche Anwendung beim Menschen

Seit der Beendigung der Experimente und der Fertigstellung der Arbeit hat sich die Situation dahingehend geändert, dass die ersten Humanversuche der Arbeitsgruppe in Tübingen mit der hier untersuchten transchorioidalen Vorgehensweise zur subretinalen Implantation durchgeführt wurden.

Grundlage für die transchorioidale Vorgehensweise beim Menschen bildeten die hier

¹⁶ vgl. Welch D. B., Bryar P., Ocular Surgery News, September 2001

untersuchten Präparate vom Schwein. Die in der Arbeit gewonnenen Erkenntnisse waren wegen der Ähnlichkeit des Tiermodells und der humanen Situation direkt übertragbar.

Bei 11 von 11 Implantationen am Menschen kam es zu keiner Komplikation durch die gefürchteten Aderhautblutungen. Dies wurde im Vorfeld häufig gegen diese neue OP-Methode als Argument ins Feld geführt und bestimmte über die Jahre die Diskussion auf internationalen Kongressen.

Durch die erfolgreiche Anwendung der neuen OP-Methode in einer prospektiven Studie am Menschen hat dieses Verfahren mittlerweile in der Fachwelt weltweite Beachtung erlangt. Die transchoriodale operative Vorgehensweise, die erstmals in dieser Form weltweit zur Anwendung kam, kann sich nun, da sie offenbar sicher durchführbar ist, im entsprechenden Bereich der Hinterabschnittschirurgie etablieren.

4.3.2. Weitere Einsatzmöglichkeiten der Radiodiathermie zur unblutigen Aderhaut-Penetration

Die Entwicklung von Methoden, nahezu ohne Blutung die Aderhaut zu penetrieren und dabei geringstmögliche Kollateralschäden zu hinterlassen, führt dazu, dass eine transchoriodale Chirurgie überhaupt möglich wird. So ergeben sich neben der Implantation elektrischer Sehprothesen weitere bislang noch wenig erforschte Möglichkeiten für eine Anwendung der Radiofrequenz-Methode in diesem Rahmen.

Neben einer **subretinalen Medikamentenapplikation** kann hier die **Entfernung chorioidaler Melanome** genannt werden, bei der klassischerweise noch vor wenigen Jahren das gesamte Auge entfernt wurde. Bestrahlungen, die bis zu einer bestimmten Größe des Prozesses durchgeführt werden können, waren ebenfalls geeignete Behandlungsmethoden. In letzter Zeit wurden aber, da sich die Überlebensraten bei der ausschließenden Chirurgie zwischen Entfernung des Tumors nicht von denen einer kompletten Entfernung des Auges unterscheiden, Verfahren entwickelt, chirurgisch die Tumore zu entfernen. Ein unblutiges Vorgehen ist auch hier sehr

erwünscht, gelingt aber bislang nicht in vollem Umfang. Bei diesen Operationen werden die Patienten zur Vermeidung von größeren Blutungen in Hypotension operiert und alle sonstigen Maßnahmen zur Blutstillung ergriffen. Die in dieser Arbeit erprobte Radiodiathermie hätte das Potenzial, auch hier Verbesserungen in der Chirurgie zu bringen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der chirurgische Erfolg von Implantationen komplexer oder größerer Sehprothesen steht und fällt mit der Möglichkeit, diese durch die Aderhaut durchzuführen. Die Aderhaut ist ein extrem stark durchblutetes Gewebe und stellt hier hohe Anforderungen an die Chirurgie, da selbst kleine Blutungen in den Subretinalraum zu erheblichen Konsequenzen führen. Aufgrund bereits guter Erfolge der Radiodiathermie auch im Bereich stark blutender Gewebe, wurde dieses Verfahren für eine effektive Blutungsstillung bei der Aderhautpenetration ausgewählt.

Die von uns durchgeführten Experimente dienten dazu, die Geräteparameter soweit zu evaluieren, dass ein zufrieden stellendes chirurgisches Vorgehen möglich war. Darüber hinaus sollte gezeigt werden, dass sich die Veränderungen, die von einem Ausbleiben der Aderhautblutung während der Chirurgie rühren, auch histologisch beschreiben und nachweisen lassen. Dabei wurde festgestellt, dass trotz einer effektiven Koagulation Kollateralschäden sowohl auf die Choroidea selbst, als auch auf die Netzhaut gering ausgeprägt waren. Alle Bulbusschichten haben ihre Intaktheit behalten, es wurden weder Blutungen, noch (mittels TUNEL-Test) vermehrt apoptotische Zellen nachgewiesen, wobei sich das morphologische Erscheinungsbild der Aderhaut insgesamt im behandelten Bereich jedoch verändert hat.

Die erfolgreiche experimentelle Anwendung der Radiodiathermie am menschenvergleichbaren Modell (Hausschwein) macht einen Einsatz auch am menschlichen Auge möglich und stellt einen wichtigen Schritt für die Forschung und Weiterentwicklung subretinaler Sehprothesen dar.

6 ANHANG

I. Bezeichnung der verwendeten Geräte:

1. Radiodiathermie:

Patented Surgitron 4.0 Dual RF, Firma Elleman (New York)

2. Laseranwendung:

*IRIS OcuLight® SL Lasersystem, Halbleiter-Diodenlaser, Firma IRIDEX
(Mountain View, California)*

3. Einbettautomat:

Shandon Excelsior, Thermo Electron Corporation (Massachusetts)

4. Rotationsmikrotom:

Jung RM 2055, Firma Leica (Wetzlar)

5. Mikroskope:

Leitz DM RD, Firma Leica (Wetzlar)

Eclipse E200, Firma Nikon (Tokio)

II. Schritte der Paraffineinbettung mittels Einbettautomat: (allgemeines Schema)

1. Fixierung (Formalin)	2 Stunden
2. 70% Äthanol	2 Stunden
3. 70% Äthanol	1 Stunde
4. 96% Äthanol	1 Stunde
5. 96% Äthanol	1 Stunde
6. 100% Äthanol	1 Stunde
7. 100% Äthanol	1 Stunde
8. 100% Äthanol	1 Stunde
9. Xylol	1 Stunde
10. Xylol	1 Stunde
11. Paraffin 60°C	2 Stunden
12. Paraffin 60°C	3 Stunden

7 LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Aimino G., Davi G., Santella M., Oculoplastic Surgery With Radiofrequency, 1st Edition Italy 1998, Full Image Editions
- 2) Arend O., Intraokuläre Ischämie, Bildsynopsis zur Pathophysiologie des Sauerstoff- und Glucosemangels im Auge, München: Med. Service, 2001
- 3) Birngruber R., Wechselwirkung zwischen Laser und Gewebe – Einführung, Bücherei des Augenarztes Band 113, Herausgegeben von J. Wollensak, Stuttgart 1988, Enke Verlag
- 4) Bron A. J., Tripathi R. C., Tripathi B. J., Wolff's Anatomy of the Eye and Orbit, Eighth Edition 1997, Chapman & Hall Medical
- 5) Feucht M., Laube T., Richard G. et al., Entwicklung einer epiretinalen Prothese zur Stimulation der humanen Netzhaut, Ophthalmologie 102:688-691 (2005)
- 6) Gabel V.-P., Zrenner E., Entwicklung einer subretinalen Sehprothese, Retina aktuell 1/2001-79
- 7) Gierschner P., Vergleichende Untersuchungen zur Kastration von Bullenkälbern durch Alteration der Blutgefäße im Funiculus spermaticus mit Hilfe der Diathermie, durch Kompression mittels der Burdizzo-Zange sowie einer transkutanen Ligatur, Berlin 2004, Mensch & Buch Verlag
- 8) Grundmann, Allgemeine Pathologie, 10. Auflage 2004, Verlag Urban & Fischer
- 9) IRIS OcuLight® SL Lasergerät Gebrauchsanweisung
- 10) Lorenz B., Birngruber R., Wechselwirkung zwischen Aderhaut und Laserlicht unterschiedlicher Wellenlänge, Bücherei des Augenarztes Band 113, Herausgegeben von J. Wollensak, Stuttgart 1988, Enke Verlag
- 11) Mutschler E., Arzneimittelwirkungen, 8., völlig neu bearbeitete und erweiterte Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2001
- 12) Roche: *In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Instruction Manual (Version November 2004)

- 13) Roche Lexikon Medizin, 4. Auflage 1999, Verlag Urban & Fischer
- 14) Romeis Mikroskopische Technik, 17., neubearbeitete Auflage, Herausgegeben von P. Böck, Urban & Schwarzenberg, München - Wien - Baltimore, 1989
- 15) Sachs H. G. et al, Transscleral implantation and neurophysiological testing of subretinal polyimide film electrodes in the domestic pig in visual prosthesis development, J. Neural Eng. 2 57-64 (2005)
- 16) Sachs H. G., Gabel V.-P., Retinal replacement – the development of micro-electronic retinal prostheses – experience with subretinal implants and new aspects, Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology 1-10 (2004)
- 17) Sachs H. G., Gabel V.-P., Sehprothesen - Prinzipien und operative Technik, Nova Acta Leopoldina NF 84, Nr. 322 183-194 (2001)
- 18) Sachsenweger M., Augenheilkunde, 2., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, 2003, Thieme Verlag
- 19) Schanze T., Sachs H. G. et al., Implantation and testing of subretinal film electrodes in domestic pigs, Experimental Eye Research 1-9 (2005)
- 20) Thomas C., Histopathologie, Lehrbuch und Atlas zur allgemeinen und speziellen Pathologie, 13. Auflage 2001, Schattauer Verlag
- 21) Trepel M., Neuroanatomie, Struktur und Funktion, 3. Auflage 2004, Verlag Urban & Fischer
- 22) Walter P., Elektronische Sehprothesen, Klinische Monatsblätter Augenheilkunde 222:471-479 (2005)
- 23) Welch D. B., Bryar P., Radiosurgery causes less heat damage than laser in blepharoplastie, Ocular Surgery News, September 1, 2001
- 24) Welsch U., Lehrbuch Histologie, 1. Auflage 2003, Verlag Urban & Fischer
- 25) Wiederholt M., H. u. B. Bräuer, Excerpta ophthalmologica, Bildatlas zur Physiologie und Pathophysiologie der Mikrozirkulation des Auges, München: Med. Service, 1999

- 26) Yanoff M., Fine B.S., Ocular Pathology, A Text and Atlas, 1975, Harper & Row, Publishers
- 27) Yanoff M., Fine B.S., Ocular Pathology, A Color Atlas, Second Edition 1992, Gower Medical Publishing
- 28) Zrenner E., Blasios G., Gabel V.-P., Sachs H. G. et al., Können elektronische Netzhautimplantate die Sehkraft wiederherstellen? Eine Übersicht, medgen 15 161-166 (2003)
- 29) Zrenner E., Retina Implantate – Sehprothesen für Blinde, Retina aktuell 1/2003-87
- 30) Zrenner E., The Subretinal Implant: Can Microphotodiode Arrays Replace Degenerated Retinal Photoreceptors to Restore Vision?, Ophthalmologica 216(suppl 1): 8-20 (2002)
- 31) Zrenner E., Gekeler F., Gabel V.-P., Sachs H. G. et al., Subretinales Mikrophotodioden-Array als Ersatz für degenerierte Photorezeptoren?, Ophthalmologie 98:357 - 363 (2001)

8 LEBENSLAUF

Persönliche Daten:

Name	Eder
Vornamen	Verena Anna
Geburtsdatum	04. Mai 1983
Geburtsort	Regensburg, Bayern, Deutschland
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Religion	römisch-katholisch
Eltern	Dr. med. Maximilian Eder, Facharzt für Augenheilkunde Anna Eder, Fremdsprachenkorrespondentin, MTA
Geschwister	ein Bruder, Christoph Eder, Student der Humanmedizin

Schullaufbahn:

1989 bis 1993	Grundschule Aiterhofen
1993 bis 2002	Johannes - Turmair - Gymnasium Straubing
Mai 2002	Abitur

Studium:

2002 bis 2004	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg (vorklinischer Abschnitt)
Herbst 2004	Ärztliche Vorprüfung
2004 bis 2009	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg (klinischer Abschnitt)
Frühjahr 2009	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Mai 2009	Approbation als Ärztin

Praktisches Jahr:

Innere Medizin	Klinikum Passau und Krankenhaus der Barmherzigen Brüder Regensburg
Chirurgie	Krankenhaus der Barmherzigen Brüder Regensburg und Royal Prince Alfred Hospital Sydney, Australien
Augenheilkunde	Universitätsaugenklinik Regensburg

9 DANKSAGUNG

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben und mich bei meiner Arbeit unterstützt haben. Insbesondere bei:

1. Herrn Prof. Dr. Gabel und Herrn PD Dr. Sachs für die Überlassung des Themas dieser Dissertation
2. Herrn PD Dr. Sachs, der sich immer Zeit für mich genommen hat und mir mit Rat und Tat zur Seite stand
3. Herrn PD Dr. Kühnel für die Übernahme der Co-Referates
4. Frau Andrea Dannullis für ihr Engagement und ihre große Hilfe bei allen Fragen und technischen Belangen im Labor
5. Frau Melanie Zink und Frau Susanne Zeinedinne für ihre Hilfe, PD Dr. Sachs bei Fragen zu kontaktieren
6. Meinem Bruder Christoph und meinem Freund Axel für Ihre Beratung und Hilfe bei allen Fragen zu Textverarbeitung und Layout dieser Arbeit
7. Ganz besonders meinen Eltern für ihre bedingungslose Unterstützung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Verena Eder