

Aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. J. Hillenkamp

**Aufbau und Implementierung eines Arbeitsablaufs zur Korrelation multimodaler
in vivo und *ex vivo* retinaler Bildgebung mit histologischen Untersuchungen**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Pia Maria Gräfin von Moltke

aus Deggendorf

Würzburg, Oktober 2021



Referent bzw. Referentin:

Priv.-Doz. Dr. Thomas Ach

Korreferent bzw. Korreferentin:

Prof. Dr. Rudolf Martini

Dekan:

Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21.03.2022

Die Promovendin ist Ärztin.

MEINEN ELTERN

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Korrelation der SD-OCT mit der Histologie	1
1.2 Retinale <i>in vivo</i> Bildgebung	2
1.2.1 <i>SD-OCT</i>	3
1.3 Altersabhängige Makuladegeneration	5
1.3.1 Pathogenesekonzepte.....	5
1.3.2 Therapie	6
1.4 CNTF.....	7
1.5 Fragestellung	9
2. Material und Methoden	10
2.1 Ethikvotum und Datenschutz.....	10
2.2 Gewinnung von Spendergewebe	10
2.3 Gewinnung und Prozessierung von Spendergewebe.....	10
2.4 Multimodale <i>in vivo/ ex vivo</i> Bildgebung.....	11
2.5 Klassifikation des Spendergewebes.....	13
2.6 Histologie und CNTF	14
2.6.1 Probenvorbereitung	14
2.6.2 Anfertigung von Gefrierschnitten.....	16
2.6.3 Immunhistochemische CNTF-Färbung	19
2.6.4 PAS-Färbung	20
2.6.5 Histologische Auswertung.....	20
2.6.6 Korrelation der multimodalen Aufnahmen.....	21
2.7 Statistik	21

3. Ergebnisse.....	22
3.1 Überblick.....	22
3.2 <i>In vivo</i> multimodale retinale Bildgebung.....	23
3.2.1 Farbfundusfotografie.....	24
3.2.2 <i>SD-OCT</i>	24
3.3 Operativer Eingriff.....	25
3.4 <i>Ex vivo</i> multimodale retinale Bildgebung.....	25
3.4.1 <i>SD-OCT</i>	27
3.4.2 Fundusautofluoreszenz.....	28
3.5 Histologische Beurteilung.....	29
3.6 Korrelation von <i>in vivo</i> und <i>ex vivo</i> Bildgebung.....	30
3.7 Spendergewebe des Advancing Sight Network.....	31
3.8 Immunhistochemie CNTF.....	32
4. Diskussion.....	34
4.1 Notwendigkeit der <i>in vivo</i> - <i>ex vivo</i> Korrelation.....	34
4.1.1 Methodische Unterschiede.....	34
4.1.2 Korrelation andere Fachgebiete.....	36
4.1.3 Korrelation Augenheilkunde.....	36
4.1.4 Korrelation in dieser Arbeit.....	38
4.2 Herausforderung Gewebegewinnung.....	39
4.3 Multimodale Bildgebung.....	42
4.4 CNTF.....	45
4.5 Limitationen.....	49
5. Zusammenfassung.....	50

6 Literaturverzeichnis	51
------------------------------	----

Appendix

I	Abkürzungsverzeichnis
II	Abbildungsverzeichnis
III	Tabellenverzeichnis
IV	Danksagung
V	Eigene Veröffentlichungen
VI	Patientenaufklärung zur Studienteilnahme

1. Einleitung

Die histologische Aufarbeitung und mikroskopische Darstellung von Geweben sind nach wie vor entscheidend in der Diagnostik und Klassifikation von Erkrankungen des Auges. Während sich zu Beginn der Mikroskopie die Darstellungsmöglichkeiten auf die Beschreibung von Geweben und Zellen beschränken mussten, sind mittlerweile hochaufgelöste Einblicke bis in den sub-zellulären Bereich und auf Protein- und Molekül-Ebene möglich (Leung and Chou 2011).

In den letzten Jahren hat die klinische Bildgebung in der Augenheilkunde mit der Entwicklung von hochaufgelöster Optischer Kohärenztomographie (OCT) zu einer Revolution in der Bildgebung des Auges geführt (Zysk, Nguyen et al. 2007). Mittels Spectral Domain-OCT (SD-OCT) sind mittlerweile Darstellungen einzelner Netzhautschichten möglich und erlauben eine Aussage zur Struktur, sowohl im Gesunden als auch bei pathologischen Veränderungen (Sakata, DeLeon-Ortega et al. 2009).

All diesen technischen Entwicklungen zur *in vivo* Darstellung hinkte aber die Validierung der Ergebnisse lange Zeit hinterher. Dabei wurde nur selten nach Wegen gesucht, das Ergebnis zu verifizieren: Nämlich ob das, was man klinisch meinte zu sehen, auch das ist, was es tatsächlich ist.

1.1 Korrelation der SD-OCT mit der Histologie

Klinisch-histologische Korrelation von *in vivo* und *ex vivo* multimodaler Bildgebung kombiniert mit dem histologischen Vergleich wäre eine Möglichkeit, diese Lücke zu schließen. Ansätze für entsprechende Untersuchungen finden sich allerdings nur sporadisch in der Literatur und scheitern oft an der Methodik, der zeitnahen Gewinnung von Untersuchungsmaterial oder der Ausstattung und den Ressourcen an den entsprechenden Zentren (Curcio 2006, Curcio 2018).

Die Bedeutung einer direkten Korrelation wurde vor allem in den letzten Jahren offensichtlich. Mit der unten beschriebenen OCT-Technologie war es plötzlich möglich, z.B.

Netzhautaufnahmen in beinahe histologischer Auflösungsqualität anzufertigen. Zur verlässlichen Interpretation fehlte aber vielfach das Wissen um die genaue zugrundeliegende Struktur. Hier konnten kürzlich insbesondere für die Altersbedingte Makuladegeneration (AMD) klinische OCT-Befunde beschrieben, histologisch korreliert und gedeutet und daraus Prognosen abgeleitet werden (Moreira-Neto, Bergeron et al. 2019, Chen, Messinger et al. 2020, Chen, Messinger et al. 2020).

Die Durchführung der Probenvorbereitung ist ein Lernprozess, benötigt aber aufgrund der zahlreichen Einzelschritte ein profundes Wissen in der technischen Durchführung. Kritisch ist auch eine adäquate Ausstattung der Labore, was für die Herstellung der Gewebeschnitte und Bildgebung essenziell ist. Die in den letzten Jahren zu beobachtende Zentralisierung pathologischer Begutachtung an Universitätskliniken ist hierbei nicht förderlich, da Wissen für viele angehende Augenärztinnen und Augenärzte nicht vermittelt werden kann.

Die Gewinnung von Spendergewebe, das für eine *in vivo/ ex vivo* Korrelation herangezogen werden kann, ist in Deutschland bislang eine Herausforderung, was sich zum Einen mit der nach wie vor eingeschränkten Bereitschaft zur Gewebespende nach dem Tod (Seitz, Bluthner et al. 2004), zum Anderen aber durch die Latenzzeit zwischen Tod und Entnahmezeitpunkt erklären lässt. Die post mortem auftretenden Veränderungen, die bereits nach wenigen Stunden nachweisbar sind, sind für sich anschließende Korrelationsstudien nicht begünstigend. Insbesondere die sehr schnell einsetzende Ablösung der Netzhaut vom Retinalen Pigmentepithel (RPE) ist hierbei zu nennen.

1.2 Retinale *in vivo* Bildgebung

Die moderne Augenheilkunde bedient sich verschiedener bildgebender Verfahren, die eine verbesserte Früherkennung und Verlaufskontrolle von ophthalmologischen Erkrankungen ermöglichen. So zählen heute Farbfundusfotografie, Autofluoreszenz (AF)- Aufnahmen, Infrarot (IR)- und Rotfrei (RF)-Bildgebung zu den Routineuntersuchungen, die für unterschiedliche Darstellungen am Auge und Pathologien eingesetzt werden können (Forte, Querques et al. 2012, Garrity, Sarraf et al. 2018).

Insbesondere die Entwicklung der OCT hat in den letzten Jahrzehnten eine Revolution der Diagnosemöglichkeiten mit sich gebracht (Bagheri, Bell et al. 2012). Es handelt sich dabei um eine kontaktlose Untersuchungsmethode, die hochauflösende *in vivo* Aufnahmen produziert. Das Prinzip der OCT beruht auf einer ähnlichen Technik wie die in der Medizin weit verbreitete Ultraschalluntersuchung. Hierbei werden allerdings im Unterschied zur Sonographie keine Schall-, sondern Lichtwellen verwendet. Über die Interferenz mit Referenzstrahlen können Entfernungen bestimmt werden. Durch die punktweise Abtastung eines Objektes wird so ein Bild einer Struktur bzw. eines Gewebes generiert (Huang, Swanson et al. 1991, Aumann, Donner et al. 2019).

1.2 1 SD-OCT

Die Weiterentwicklung zur SD (spectral domain)-OCT, 1995 von Fercher et al. vorgestellt, hat dabei weitere Verbesserungen im Bereich der Auflösung und der Aufnahmegeschwindigkeit bewirkt (Fercher, Hitzenberger et al. 1995, Regatieri, Branchini et al. 2011). Der Detektor ist hierbei mit einem Spektrometer ausgestattet. Dieser separiert die Spektren des interferierenden Lichts und führt diese zu einem Bild zusammen. Durch die Einführung der SD-OCT konnte die Aufnahmegeschwindigkeit stark erhöht werden und liegt bei weit über 85.000 Hz. Im Jahr 2006 wurde die SD-OCT-Technik mit einem Laser-Scanning-Ophthalmoskop kombiniert, was sichere, einfach durchführbare und sehr schnelle Untersuchungen ermöglicht, als Einzelaufnahme aber auch im zeitlichen Vergleich (Aumann, Donner et al. 2019).

Die SD-OCT ist heute aus der ophthalmologischen Diagnostik, insbesondere der Netzhautdiagnostik, nicht mehr wegzudenken. Mittels OCT-Technik lassen sich sowohl Vorder- als auch Hinterabschnitt des Auges untersuchen und findet deshalb Anwendung im Bereich der Glaukomdiagnostik, zur Untersuchung von Kornea, Sklera sowie Kammerwinkel und vor allem zur Beurteilung von Netzhaut und Aderhaut. Die Präzision, mit der SD-OCT-Aufnahmen die Netzhaut in sagittaler und vertikaler Abbildungsrichtung darstellen, erlaubt Aufnahmen am lebenden Menschen in quasi "histologischer" Auflösung. Entsprechend ist auch die SD-OCT Anwendung an post mortem gewonnenem Gewebe beschrieben (Chen, Cense et al. 2006, Ghazi and Knappe 2006, Brown, Koreishi et al. 2009).

Reflexionsänderungen an Gewebeschichten bzw. an Organellen einzelner Zellen können detektiert werden und stellen sich dann als hyper- bzw. hyporeflektive Strukturen dar. Somit lassen sich beispielsweise nicht nur einzelne Netzhautschichten, sondern sogar Unterschiede in der Reflexion innerhalb einzelner Zellschichten (vor allem von Fotorezeptoren und Retinalem Pigmentepithel) weiter unterscheiden. Staurenghi et al. haben 2014 eine Konsensus-Nomenklatur erarbeitet, die bei Gesunden mehr als 20 Schichten der Netzhaut und Aderhaut unterscheiden lässt (Abbildung 1) (Staurenghi, Sadda et al. 2014).

Diese *in vivo* darstellbaren, unterschiedlichen Schichten wurden mittlerweile auch den histologischen Korrelaten gegenübergestellt (Zanzottera, Messinger et al. 2015, Li, Dolz-Marco et al. 2019).

Eine wichtige Anwendung der SD-OCT findet sich in der Diagnostik, Therapieentscheidung und Verlaufskontrolle der Altersbedingten Makuladegeneration (Regatieri, Branchini et al. 2011).

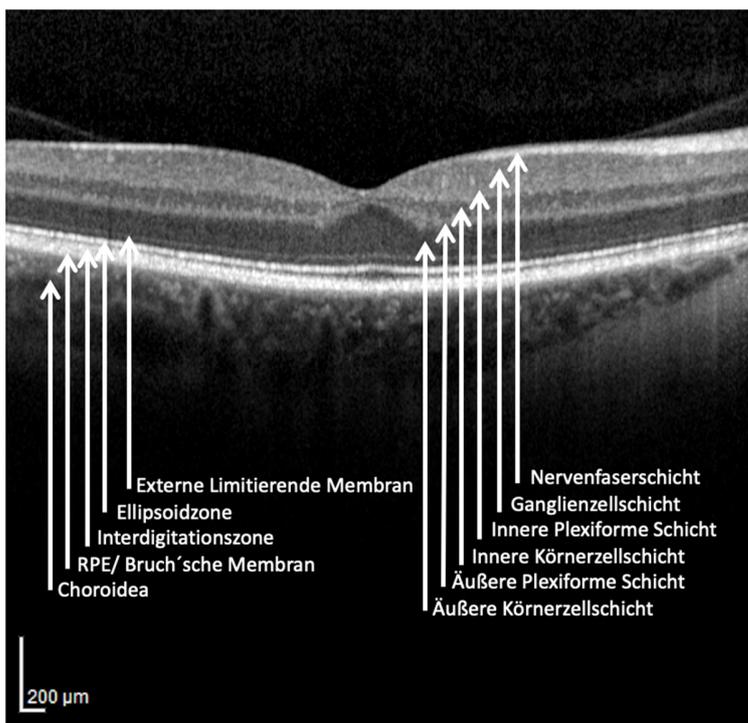


Abbildung 1: **Physiologischer OCT-Schnitt durch die Fovea.** Beispielaug eines Normalprobanden der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Würzburg mit unauffälliger Makula zur Darstellung einzelner Netzhaut-Schichten. Physiologische retinale Schichten von Nervenfaserschicht bis Choroidea. RPE = Retinales Pigmentepithel; OCT = Optische Kohärenztomographie.

1.3 Altersabhängige Makuladegeneration

1.3.1 Pathogenesekonzepte

Die AMD ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters und eine der häufigsten Erblindungsursachen in den entwickelten Staaten (Flaxman, Bourne et al. 2017). Die Pathogenese einer AMD ist multifaktoriell und nicht abschließend geklärt. Häufig diskutierte Pathomechanismen stellen chronische Inflammationen, Fehler im Rahmen der Protein-Homöostase, oxidativer Stress, Dysfunktion der Mitochondrien, Komplementaktivierung sowie immunologische Ansätze dar (Damico, Gasparin et al. 2012, Salminen, Ojala et al. 2012, Ferrington, Sinha et al. 2016, Kauppinen, Paterno et al. 2016, Lefevre, Toft-Kehler et al. 2017, Copland, Theodoropoulou et al. 2018, Kauppinen 2020). Als Risikofaktoren zählen zunehmendes Alter und das Rauchen.

Bei der AMD wird zwischen Früh-, Intermediär- und Spätformen unterschieden, wobei Letztere weiter in eine trockene (Geographische Atrophie) und neovaskuläre/exsudative Form unterteilt werden (Ferris III, Wilkinson et al. 2013).

Klinisch wird von einer AMD bei Vorliegen von subretinalen und sub-RPE Ablagerungen sowie von Veränderungen des RPE gesprochen. Nach Ferris et al. werden zur klinischen Definition einer AMD und Einteilung des Progressionsstadiums einer AMD Fundusaufnahmen herangezogen und anhand des Vorhandenseins und der Größe von Drusen und Pigmentveränderungen beurteilt (Ferris III, Wilkinson et al. 2013). Der Akkumulation von extrazellulärem, sub-RPE Material (Drusen) scheint dabei eine entscheidende Rolle zuzukommen. Typische altersbedingte und, im Verlauf, AMD-bedingte Veränderungen sind lipidreiche Ablagerungen im Bereich der äußeren Netzhaut. Diese können dabei sowohl im subretinalen Raum (retikuläre Pseudodrusen/subretinal drusenoid deposits; Vor allem im Bereich der Perifovea und bis über die Gefäßbögen hinaus) und im sub-RPE zwischen RPE und Bruch-Membran (weiche Drusen; vor allem im Bereich der Fovea) auftreten. Drusen sind einem zeitlichen Wandel unterworfen, führen nach Regression aber meist auch zu einer Atrophie der umliegenden Zellschichten, insbesondere von RPE und Fotorezeptoren (Schuman, Koreishi et al. 2009, Schlanitz, Baumann et al. 2017).

Während bei etwa 90% der AMD-Betroffenen die oben genannten Veränderungen vorliegen und einer nicht-exsudativen und nicht-neovaskulären AMD entsprechen, kommt es bei 10% der Patienten durch Hypoxie und der damit einhergehenden Ausschüttung von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) zur Bildung neuer Gefäßmembranen (neovaskuläre AMD) (Hernández-Zimbrón, Zamora-Alvarado et al. 2018). Diese führen zu Exsudationen und Blutungen im Bereich der Makula und können ohne Behandlung schlussendlich in einer Makulanarbe resultieren (Junius-Kuhnt-Makulopathie) (Donders 1855, Junius 1926).

AMD Patienten bemerken bei beiden Formen eine zunehmende zentrale Sehschwäche, die besonders die Leseleistung beeinträchtigt, Metamorphopsien, sowie Störungen in der Dunkeladaption. Während es bei den nicht-exsudativen AMD Formen langsam zu einer zunehmenden Atrophie des RPE und der Fotorezeptoren kommt, schreitet die feuchte AMD deutlich schneller fort und ist ebenso mit einer schlechteren Visusprognose assoziiert (Bressler, Bressler et al. 1988).

1.3.2 Therapie

Aktuell kann nur die neovaskuläre, exsudative Form der AMD behandelt werden. Hierzu werden in den Glaskörper anti-VEGF Medikamente injiziert, die meist regelmäßig und über einen längeren Zeitraum verabreicht werden müssen. Für die frühen und intermediären Formen sowie die trockene Spätform der AMD ist im Gegensatz hierzu lediglich ein abwartendes Vorgehen möglich. Protektiv auf eine AMD-Progression haben sich bislang mediterrane Kost und Nahrungsergänzungsmittel nach der AREDS (Age-Related Eye Disease Study) Formel gezeigt. Ein Stopp bzw. eine Heilung der Erkrankung kann damit aber nicht erzielt werden, im besten Falle eine Verzögerung (Group“ 1999).

Da die Ursachen einer AMD als multifaktoriell anzusehen sind, zielen die wissenschaftlichen Ansätze zur Behandlung einer AMD mittlerweile ebenfalls auf verschiedene Ansätze ab (Kaiser 2019). Diese können orientierend in fünf großen Gruppen kategorisiert werden: 1. Modifikation des Sehzyklus, 2. Vermeidung neurotoxischer Abbauprodukte, 3. Stammzelltherapien, 4. Antiinflammatorische Therapie, 5. Neuroprotektion. Weitere alternative Ansätze beziehen sich auf Biomodulationen, Inflammasom-Therapien und Matrix-Modulationen (Kaiser 2019).

Eine Modifikation des Sehzyklus in den Fotorezeptoren zielt auf eine Reduktion von Stoffen ab, die im Zusammenspiel mit Licht zur Freisetzung von freien Radikalen führen. Hier befindet sich aktuell ALK-001, ein modifiziertes Vitamin A Molekül, das im Körper natürlich vorkommendes Vitamin A ersetzen und so die Dimerisierung verlangsamen soll, bereits in einer Phase 3-Zulassungsstudie (Alkeus Pharmaceuticals 2019). Ein weiterer Therapieansatz ist die Vermeidung einer Akkumulation von neurotoxischen Produkten. Dabei wird versucht, die Akkumulation von Amyloid A β oder die Lipidperoxidation zu reduzieren (z.B. GAL-101, RT011) (Kaiser 2019, Seddon 2021).

Die Stammzelltherapie ist sonst eher aus der Behandlung maligner Erkrankungen bekannt, mittlerweile wird sie auch als mögliche Therapie für weitere Erkrankungen erkannt. Für die AMD gibt es einige vielversprechende Ansatzpunkte, die aktuell untersucht werden. Ersatz von einzelnen Gewebeschichten der äußeren Netzhaut sind hier in verschiedenen Organoidmodellen in Erprobung (Kaiser 2019, Seddon 2021).

Basierend auf der Annahme, dass es im Rahmen der AMD zu Entzündungsvorgängen kommt und beispielsweise auch in Drusen Komplement nachgewiesen wurde, stellt die Entzündungshemmung einen wichtigen Ansatzpunkt dar. Insbesondere im Bereich der Komplementinhibition werden aktuell zahlreiche mögliche Therapeutika untersucht, auch wenn bislang keines der Produkte erfolgreich die Endpunkte in einer Phase III erreicht hat (Kaiser 2019, Seddon 2021).

Schließlich spielen neuroprotektive Ansätze eine wichtige Rolle. Wirkstoffe wie Elamipretide und Risuteganib sollen positive Effekte auf die mitochondriale Dysfunktion des RPE haben und oxidativen Stress reduzieren. Seit einigen Jahren wird auch die Wirkung von Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) zur Neuroprotektion von Zellen der äußeren Netzhaut untersucht (Kaiser 2019, Seddon 2021).

1.4 CNTF

CNTF ist ein neuropoetisches Zytokin aus der Interleukin (IL)-6-Familie, das an vielen neurologischen Strukturen im Bereich des peripheren und zentralen Nervensystems positive Effekte auf das Überleben, die Differenzierung und die Proliferation von Zellen hat (Boulton,

Stahl et al. 1994). Dies wurde an verschiedenen Spezies gezeigt: Maus, Ratte, Katze, Hund (LaVail, Unoki et al. 1992, Chong, Alexander et al. 1999, Liang, Aleman et al. 2001, Tao, Wen et al. 2002). Die Zuordnung zu den Interleukinen der IL-6-Gruppe besteht, da alle Zytokine dieser Gruppe als Gemeinsamkeit die Rezeptor-Untereinheit gp130 besitzen. Sie vermitteln ihr Signal über ein Homodimer aus zwei gp130-Einheiten oder alternativ über ein Heterodimer aus gp130 und LIFR β . Zusätzlich besteht der CNTF-Rezeptor aus dem spezifischen CNTF-Rezeptor α (Boulton, Stahl et al. 1994). Der Rezeptorkomplex vermittelt seine intrazellulären Signale über die JAK/STAT3-Signalkaskade (Rose-John 2018).

CNTF zeigte sein therapeutisches Potenzial im Bereich der Augenheilkunde bereits vor über 20 Jahren in verschiedenen Tiermodellen (z.B. Mäusen und Katzen), in denen durch die Gabe des Zytokins das Überleben von Fotorezeptoren der Retina verbessert werden konnte (Chong, Alexander et al. 1999, LaVail, Yasumura et al. 1998). Basierend auf Ergebnissen der Grundlagenwissenschaft an Tiermodellen wurden bei der Spätform der trockenen AMD, der sogenannten Geographischen Atrophie (GA), und bei der Retinitis Pigmentosa bereits Phase 1-/ 2-Studien am Menschen zur Wirksamkeit und Sicherheit von CNTF durchgeführt (Sieving, Caruso et al. 2006, Kauper, McGovern et al. 2012, Birch, Weleber et al. 2013). Zhang et al. beschrieben 2011 eine dosisabhängige Visusstabilisierung, ebenso zeigten sich Läsionen bei GA nach CNTF-Gabe stabil und konnten einen Anstieg der retinalen Dicke nachweisen, allerdings bei einer nur sehr kleinen Studienpopulation (Zhang, Hopkins et al. 2011). Weitere Studien wurden durchgeführt in Bezug auf die Makuläre Teleangiektasien Typ 2 (Mac Tel 2). In einer klinischen Phase I-Studie von Chew et al. an Patienten mit Mac Tel 2 konnte ebenfalls die klinische Sicherheit in der Anwendung von CNTF mittels Encapsulated Cell Technology (ECT) bestätigt werden. Klinische Effekte wurden nicht bestätigt, auch hier sind weiterführende Studien geplant bzw. derzeit in Auswertung (Chew, Clemons et al. 2015).

Trotz dieser bereits im Menschen durchgeführten Untersuchungen gibt es bislang keine grundlagenwissenschaftlichen Daten zur Expression von CNTF und CNTF-Rezeptoren in der humanen Retina. Des Weiteren ist wenig über die Veränderung der Konzentration des Proteins CNTF bei menschlichen retinalen Erkrankungen, insbesondere der AMD, bekannt.

1.5 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, einen Arbeitsaufbau und eine Arbeitsabfolge zur erfolgreichen und standardisierten *in vivo/ ex vivo* multimodalen Bildgebung an menschlichem Spender-Augengewebe zu etablieren. Mit der sich anschließenden, weiterführenden Analyse des Gewebes sollen Möglichkeiten zur Korrelation von *in vivo/ ex vivo* Bildgebung mit feingeweblichen Untersuchungen (z.B. Histologie, Elektronenmikroskopie, Immunhistochemie) geschaffen werden.

Hierzu sollen die bestehenden Aufnahmemethoden erweitert und ein standardisiertes Protokoll für die Probenvorbereitung und die *in vivo/ ex vivo* Bildgebung erstellt werden. Dieser Aufbau ist bestimmt für die Untersuchung von humanen Proben, die Veränderungen auf zellulärer und sub-zellulärer Ebene mit den klinischen Aufnahmen korrelieren lassen. Dies wird anhand eines menschlichen Auges gezeigt.

Am Beispiel der immunhistochemischen Analyse von CNTF in humanen Netzhautproben mit AMD-Veränderungen soll abschließend beispielhaft das Potential des vorab beschriebenen Aufbaus zur Beantwortung wissenschaftlicher Fragestellungen aufgezeigt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Ethikvotum und Datenschutz

Die hier dargestellte Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Würzburg im Vorfeld als positiv bewertet (#187/17, #210/15). Diese Arbeit wurde zudem nach den „Ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen“, erläutert in der Deklaration von Helsinki (WMA 2013) und nach den Regeln der Good Clinical Practice durchgeführt. Die zum Zeitpunkt der Datenerhebung geltenden Datenschutzregeln wurden eingehalten. Patientenrelevante Daten wurden in der vorliegenden Studie nur anonymisiert bzw. pseudoanonymisiert verarbeitet.

2.2 Gewinnung von Spendergewebe

Zur Validierung der in dieser Arbeit vorgestellten *in vivo/ ex vivo* Korrelation wurde Spendergewebe verwendet, das in der Augenklinik des Universitätsklinikums Würzburg gewonnen wurde. Beim hier exemplarisch dargestellten Bulbus handelt es sich um das rechte Auge eines 67-jährigen Patienten mit klinischer Indikation zur Enukleation (klinische Indikation: Amaurose bei Zustand nach Zentralarterienverschluss mit massiver Rubeosis iridis und schmerzhafter Tensiodekompensation). Dieser wurde über die Möglichkeit zur Bulbusspende ausführlich aufgeklärt (siehe Anhang) und nach erfolgter Bedenkzeit und schriftlicher Einwilligung in die Studie eingeschlossen.

Weitere Gewebeproben wurden vom Advancing Sight Network, Birmingham, AL, USA, rekrutiert (siehe unten).

2.3 Gewinnung und Prozessierung von Spendergewebe

Nach der *in vivo* Bildgebung (siehe unten) erfolgte bei o.g. Patient die Enukleation am Folgetag. Sofort nach der Entnahme wurde der Bulbus direkt im Operationssaal präpariert. Dabei wurde mit einem Trepan (18mm Durchmesser) eine Corneoskleral-Scheibe proximal

der Ora serrata ausgestanzt, sowie Linse und Iris mittels einer feinen Präparationsschere entfernt. Anschließend wurde der Rest-Bulbus sofort in ein Fixans aus 4 % Paraformaldehyd (PFA) gelegt, so dass die Zeit zwischen Trennung der Blutzufuhr bis zur Fixierung weniger als 5 Minuten betrug.

Ähnlich wurden die Gewebespenden aus den USA prozessiert (Messinger, Kimble et al. 2018). Diese wurden maximal 6,5 Stunden post mortem enukleiert, sowie vor Ort direkt präpariert. Dazu wurde die Hornhaut mittels Trepanation (18 mm) entfernt und die Iris (zur besseren Gewebegängigkeit des Fixans) mit einer chirurgischen Schere radiär eingeschnitten. Die Bulbi wurden in 4% PFA fixiert und an das Labor Dr. Curcio (Birmingham, Alabama) versandt. Dort wurden die bereits vorpräparierten Augen mithilfe einer mikrochirurgischen Schere unter dem Mikroskop von Iris und Linse befreit, sodass der komplette vordere Augenabschnitt entfernt wurde. Das Gewebe wurde in 4% PFA fixiert und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.4 Multimodale *in vivo*/ *ex vivo* Bildgebung

Die multimodale Bildgebung (prä- und postoperativ sowie post mortem) bestand, sofern durchführbar, aus: 1. Farbfundusfotographie, 2. hochaufgelöster SD-OCT und 3. confocal Scanning Laser Ophthalmoscopy (cSLO):

1. Farbfundusfotographie: *in vivo* durchgeführt mit einer digitalen Funduskamera (FF450, Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Für die *ex vivo* Farbfundusfotographie wurde ein Dissektionsmikroskop (Einheit aus einem Mikroskop und einer Digitalkamera) aufgebaut. Dazu wurde eine Digitalkamera (D7200, Nikon, Minato, Japan) über zwei Adapter (Nikon-Adapter, F-Bajonett, T2; Kamera-Adapter T2-T2 DSLR 1,6) mit einem Mikroskop konnektiert (Stemi 508 trino, Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Zusätzlich wurde für die verbesserte Ausleuchtung am Mikroskop eine Doppelkopfleuchte (Schwanenhals-Doppelpot-Leuchte K LED) angebracht. Die Bulbi wurden mithilfe des Mikroskops ausgerichtet, sodass sich Sehnerv und Makula in einer horizontalen Linie befanden. Daraufhin erfolgte die Aufnahme mittels der angebrachte Digitalkamera. Die Aufnahmen erfolgten als Trans-, Epi- und Blitz-

Beleuchtung in verschiedenen Vergrößerungen. Diese Aufnahmen dienen der Darstellung von offensichtlichen Pathologien, die für die anschließende pathologische Klassifikation herangezogen werden können.

2. SD-OCT: mittels SPECTRALIS (Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Deutschland). Dazu wurde ein Makula-Volumenscan angefertigt (6x6mm entspricht etwa 20x20° am Augenhintergrund). Jeder Volumenscan bestand aus 49 Einzelscans, diese wiederum aus mindestens 35 gemittelten Einzelaufnahmen (ART Mode).
3. cSLO: HRA2 (Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Deutschland, Baujahr 2015/06, SN Spec-KT 0564). Hierbei wurden Infrarot- ($\lambda = 820 \text{ nm}$) und rotfreie Aufnahmen ($\lambda = 488 \text{ nm}$), sowie Blau-Autofluoreszenz- (BAF; $\lambda = 488 \text{ nm}$) als auch Nah-Infrarot (NIR) - Autofluoreszenz-Bilder ($\lambda = 787 \text{ nm}$) angefertigt. Die Bildgröße betrug jeweils 30° x 30°, 768 x 768 Pixel (Greenberg, Duncker et al. 2013, Kleefeldt, Bermond et al. 2020).

Für die *ex vivo* Aufnahme mittels SD-OCT und cSLO wurde eine Halterung benötigt, die den Bulbus in derselben Position hält, wie er auch in der *in vivo*-Bildgebung aufgenommen wird. Ein entsprechender Halter wurde als Einzelstück angefertigt und kommerziell erworben. Der Augenhalter besteht aus einer hohlen Kammer mit quadratischem Grundriss aus Aluminium, bei der zusätzlich am Boden eine Deckplatte befestigt ist, die zur Fixierung an einer Verbindungshalterung zum Aufnahmegerät verwendet wird. Im vorderen Bereich der Halterung befindet sich eine 8 mm große zirkuläre Aussparung, die mit einer Linse (plankonvex, 50 Dioptrien) versehen wurde, um die fehlenden brechenden Medien nach Präparation des Vorderabschnitts zu ersetzen. Zur Stabilisierung des Bulbus wurde eine herausnehmbare quadratische Platte (ebenfalls aus Aluminium) gefertigt, die in Querrichtung eine konkave Mulde enthält. Unter dieser Platte können weitere Plastikscheibchen unterschiedlicher Dicke eingelegt werden, um den Bulbus auf die korrekte Höhe im Verhältnis zur Kunstlinse zu bringen. Nach dorsal kann der Bulbus über weitere Plastikscheibchen fixiert werden. Dieser Augenhalter kann über eine bewegliche Halterung mit mehreren Gelenken an der Stirnvorrichtung der Aufnahmegeräte befestigt werden, sodass der Bulbus genau der Position entspricht, die es bei einer *in vivo*-Aufnahme einnimmt.

Für die Aufnahmen wurde der Bulbus aus dem Fixans (4% PFA) genommen und von 0,9% Natriumchlorid-Lösung umspült.

Alle Bilder wurden vom Untersucher direkt im Anschluss an die Aufnahme auf Qualität untersucht. Kriterien waren dabei die homogene Ausleuchtung und Zentrierung auf den hinteren Augenpol sowie die möglichst scharfe Abbildung der Fovea. Aufnahmen, die diese Kriterien nicht erfüllten, wurden aussortiert und bei Bedarf neu aufgenommen. Alle Aufnahmen wurden im Anschluss von den Aufnahmegegeräten exportiert und mit FIJI (Schindelin, Arganda-Carreras et al. 2012) und/ oder Photoshop Elements (2020, Adobe Systems Software Ireland Limited) nachbearbeitet (optimale horizontale Ausrichtung der Aufnahmen; Kontrastverstärkung; Intensivierung der Farben). Die Erstellung der Abbildungen erfolgte mit Microsoft PowerPoint (Version 16,49, Microsoft Corporation, Redmond, USA).

2.5 Klassifikation des Spendergewebes

Nach der *ex vivo* Bildgebung wurden alle Gewebe bezüglich Pathologien nach dem „Alabama Grading System“ (Curcio, Medeiros et al. 1998) klassifiziert. Mittels Epi- und Durchlichtmikroskopie (Zeiss Axio Observer D1 Mikroskop, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) wurde hier an den Bulbi eine Einteilung vorgenommen. Dabei wurden verschiedene Stadien der AMD (fraglich AMD, frühe AMD, sowie die AMD Spätformen atroph und neovaskulär) von gesunden Augen und solchen mit anderen Erkrankungen unterschieden. Einer AMD-Diagnose mussten Veränderungen des RPEs mit Drusen und Subretinal Drusenoid Deposits (SDD) mit oder ohne Anzeichen von Neovaskularisationen und ohne Hinweis auf andere mögliche Netzhauterkrankungen zugrunde liegen. Bei fraglichen Befunden der Epi- und Durchlichtmikroskopie wurden zusätzlich auch vorhandene cSLO-Bilder zur Diagnosesicherung herangezogen.

2.6 Histologie und CNTF

2.6.1 Probenvorbereitung

Für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurden zusätzlich zu den Organspenden aus Würzburg auch Proben aus dem Labor Dr. Curcio (Birmingham, Alabama) verwendet. Sämtliches Spendergewebe aus den USA wurde dabei vom Labor Curcio über das gemeinnützige Advancing Sight Network erworben (Advancing-Sight-Network 2021). Die Gewebe aus Birmingham wurden dabei identisch zu den Proben aus Würzburg bereits im Labor Curcio vorbereitet, um Artefakte am Bulbus durch lange Transportwege zu vermeiden.

Die weitere Fixierung der Spenderbulbi erfolgte über eine Verdünnungsreihe mit aufsteigender Sättigung an Saccharoselösung bis zu einer 30-prozentigen Verdünnung und einer sich anschließenden zweiten Verdünnungsreihe mit einer Aufsättigung von Saccharose zu Optimal Cutting Temperature Compound (O.C.T., Tissue Tek (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen im Breisgau, Deutschland)) bis zu einem Verhältnis von 1:4. Dies wurde nach einem standardisierten Protokoll bei 4 °C durchgeführt.

Zur Einbettung wurden die Augen zunächst in einem eigens angefertigtem Schneideblock (90x60x25 mm mit zentraler halbkugelförmiger Aussparung mit mehreren Nuten als Schnitthilfe) ausgerichtet. Der fixierte Bulbus wurde im Schneideblock mit Hilfe scharfer Klingen im Bereich der Nuten in 3 Teile geteilt (superior, inferior und zentral mit Makula und Sehnerv). Zur Orientierung im Schneideblock diente dabei eine Markierung am superioren Pol des Bulbus (Musculus rectus superior), sowie der Nervus Opticus und die Makula (Abbildung 2).

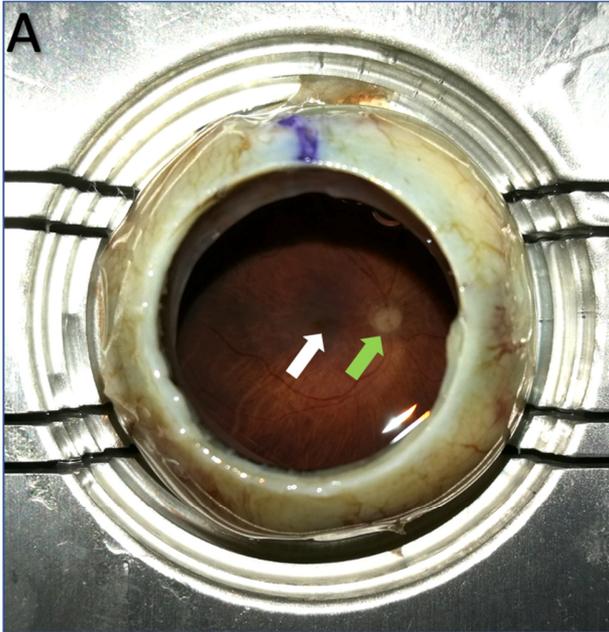


Abbildung 2: **Ex vivo Präparation.** **A:** Bulbus im Schneideblock, blaue Markierung zeigt die 12h Position (= ehemaliger Ansatz des M. rectus superior); Weißer Pfeil: Makula; Grüner Pfeil: Sehnerv mit abgehenden Gefäßbögen; **B:** Zuschnitt des Bulbus im Schneideblock zur Abtrennung der superioren und inferioren Bulbusanteile.

Der superiore und inferiore Anteil wurden für diese Studie nicht benötigt und dem Fixans zur langfristigen Aufbewahrung wieder zugefügt. Der zentrale Anteil (Abbildung 3) mit einer festen Breite von 14 mm wurde erneut unter mikroskopischer Übersicht ausgerichtet. Danach folgte die weitere Präparation des überschüssigen Gewebes ab der Ora serrata nach anterior, um eine weitere Reduzierung und weniger Konkavität des Gewebes zu erreichen. Dadurch gelang eine Reduzierung artifizierlicher Netzhautablösungen. Eine spezielle Gefriervorrichtung („Peel-A-Way“ Disposable Embedding Molds 22 x 22 x 20; Polysciences Europe GmbH,

Hischberg, Deutschland) wurde zu einem Drittel mit Tissue Tek gefüllt und über flüssigem Stickstoff gefroren. Anschließend wurde der zentrale Gewebeteil (siehe oben) auf dieser Schicht unter mikroskopischer Sicht ausgerichtet, sodass der Nervus Opticus leicht nach inferior im Vergleich zur Makula rotiert war. Daraufhin wurden die Ränder der Gefriervorrichtung vorsichtig unter Vermeidung einer artifiziellen Netzhautabhebung weiter mit Tissue Tek aufgefüllt und erneut in flüssigem Stickstoff durchgefroren. Die so eingebetteten Bulbi konnten in einem verschlossenen Beutel bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt werden.

2.6.2 Anfertigung von Gefrierschnitten

Die Anfertigung der histologischen Gefrier-Schnitte erfolgte am Kryostat Leica CM 3050S (Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland). Dabei wurde die Kammertemperatur auf -17°C und die Objekttemperatur auf -20°C festgesetzt. Bei Bedarf wurden diese Werte um maximal $\pm 2^{\circ}\text{C}$ adjustiert. Der Gewebeblock wurde so auf dem Schneidaufsatz fixiert, dass die Schnittrichtung von inferior durch das Auge erfolgen konnte. Dadurch und durch die zuvor beschriebene Rotation des Auges bei Einbettung wurde sichergestellt, dass zunächst der Sehnerv und im Anschluss die Fovea angeschnitten werden konnte. Nach Zuschneiden und Trimmen wurden die Schnitte auf dem Objektträger (beschichtet mit 10% poly-L-lysine (Sigma Aldrich, Merck-KGaA, St. Louis, Missouri, USA)) aufgenommen, sobald Retina angeschnitten wurde. Die Schnittdicke betrug $12\mu\text{m}$ extrafoveal und $10\mu\text{m}$ im Bereich der Fovea. Zunächst (sobald Retina lichtmikroskopisch nachgewiesen wurde) wurden je 25 periphere Schnitte verworfen und anschließend 2 Schnitte pro Objektträger fixiert. Bei Anschnitt des Sehnervs wurden die Intervalle der aufzunehmenden Schnitte verkürzt auf zunächst 10 und anschließend 5 verworfene Schnitte. Im Bereich der Fovea wurde jeder Schnitt konserviert und je auf einen eigenen Objektträger aufgenommen. Im weiteren Verlauf wurden die Intervalle entsprechend dazu wieder vergrößert. Die Intervalle und Schnittdicken wurden jeweils dokumentiert, sodass eine genaue Korrelation des Abstands der einzelnen Schnitte zur Fovea möglich ist. Ebenso wurden die Schnitte unter stetigem lichtmikroskopischem Vergleich zur *ex vivo* OCT-Aufnahme angefertigt und sich dabei an wichtigen „Landmarks“ (z.B. Drusen, Netzhautgefäße) orientiert. Die so angefertigten

Schnitte wurden bei 38°C für 24 Stunden hitzefixiert und im Anschluss vor der Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Von jedem Auge wurden aus logistischen Gründen exakt 100 Objektträger aufbewahrt (Abbildung 4).

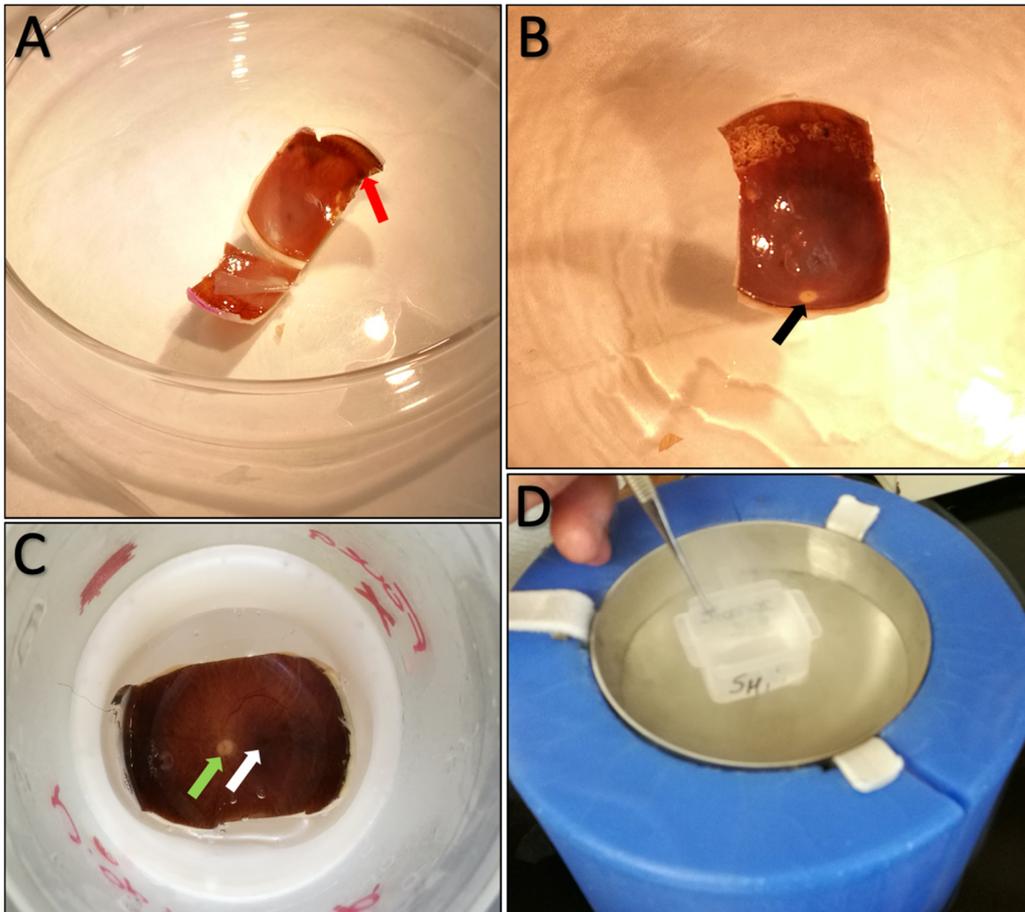


Abbildung 3: *Ex vivo* Präparation eines zentralen Gewebegürtels, Ausrichtung und Anfertigung eines Gefrierblocks. **A:** Weiterer Zuschnitt des hinteren Augenpols mithilfe einer Rasierklinge, Abtrennung der Peripherie ab Ora serrata (roter Pfeil), Restgewebe noch belassen; **B:** Fertig präpariertes Gewebe; Schwarzer Pfeil: Nervus Opticus; **C:** Gewebe in Gefrierform auf gefrorenem Tissue Tec O.C.T.; Grüner Pfeil: N. Opticus; Weißer Pfeil: Makula; **D:** Gefrierform mit Tissue Tec über flüssigem Stickstoff; O.C.T. = Optical Cutting Temperatur Compound.

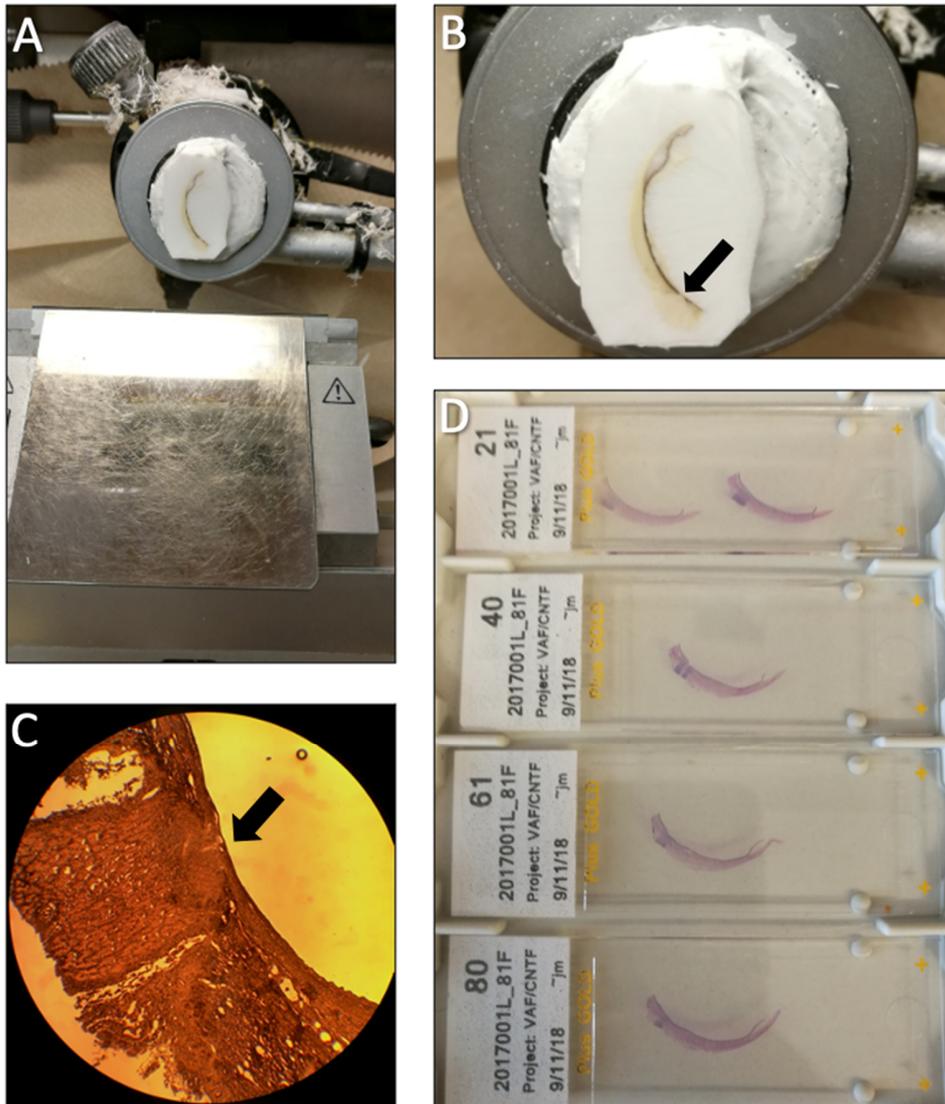


Abbildung 4: **Herstellung von Gefrierschnitten und Orientierung im Gewebe.** **A:** Eingespannter Gefrierschnittblock, retinales Gewebe angeschnitten; **B:** Anschnitt der Retina mit Choroidea und Sklera, Sehnerv sichtbar (schwarzer Pfeil); **C:** Kontrolle der Schnitte unter dem Lichtmikroskop: Sehnerv angeschnitten (schwarzer Pfeil); **D:** PAS-Färbung; PAS = Periodic Acid Schiff Reaction.

2.6.3 Immunhistochemische CNTF-Färbung

Die Färbung der humanen retinalen Schnitte erfolgte nach standardisiertem Protokoll. Dazu wurden die Schnitte zunächst für 15 Minuten in 1% PBS (Phosphate-Buffered Saline) eingelegt. Dieses wurde aus 81,8g NaCl, 2g KCl, 14,4g Na₂HPO₄ in einem Liter destillierten Wasser als 10% PBS hergestellt. Nach Einstellung des pH auf 7,35 erfolgte die Verdünnung zu 1% PBS mit destilliertem Wasser und eine erneute pH-Einstellung auf 7,35. Danach wurde zum chemischen Zellaufschluss eine Lösung von 0,5% Triton X-100 (MERCK - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt, Deutschland) (in PBS) für eine Stunde zugegeben. Es folgten 2 Waschschrte für je 10 Minuten mit 1% PBS. Danach wurde eine Blockinglösung aus 5% Normal Goat Serum (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 5% Bovinem Serum Albumin (MERCK - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt, Deutschland) und 0,1% Tween 20 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Nürnberg, Deutschland) in PBS hergestellt und diese nach Filtrierung für 1 Stunde auf die Objektträger gegeben. Die Blocking-Lösung wurde weiter im Verhältnis 1:10 mit 1% PBS verdünnt und u.a. zum Ansetzen des Primär-Antikörpers verwendet. Für Proben wurde dazu ein CNTF-Antikörper (Anti-CNTF antibody ab46172; Rabbit polyclonal to CNTF; IgG; Abcam; Cambridge, UK) im Verhältnis 1:2000 verdünnt und auf die Proben gegeben. Negativkontrollen wurden dagegen ausschließlich mit verdünnter Blocking-Lösung bedeckt. Die Inkubationszeit betrug dabei standardisiert 2 Stunden bei Raumtemperatur (20 °C), dann 12 Stunden bei 4 °C. Daraufhin erfolgten erneut 3 Waschschrte für je 10 Minuten mit 1% PBS. Nun wurde ein farbstoffmarkierter Sekundär-Antikörper (Alexa Fluor 647; Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody; Polyklonal; RR-ID: AB_2535812; Katalog-Nummer A-21244; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in verdünnter Blocking-Lösung angesetzt (Alexa 647 im Verhältnis 1:500). Die Schnitte wurden damit für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf erfolgten erneut 3 Waschschrte mit PBS zu je 10 Minuten. Zur Zellkernfärbung wurde DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole-dihydrochloride; PubChem Substance ID: 329748990; 10236276001 Roche, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) im Verhältnis 1:2000 in PBS verdünnt und für 15 Minuten auf die Schnitte gegeben. Abschließend musste 3-mal für je 5 Minuten mit PBS gewaschen werden, bevor die Objektträger eingedeckt werden konnten. Die so gefärbten Schnitte wurden bei 4°C bis zur Mikroskopie aufbewahrt.

Zur Bestimmung der optimalen Immunhistochemie wurden im Vorfeld Versuche mit veränderten pH Konzentrationen von PBS, unterschiedlichen Inkubationszeiten und -temperaturen sowie Verdünnungsreihen des Primär- und des Sekundär-Antikörpers durchgeführt. Die oben beschriebenen Methoden stellten sich dabei als ideal heraus.

2.6.4 PAS-Färbung

Zur besseren Orientierung wurden von jedem Auge standardisiert die Objektträger mit den Nummern 21, 40, 61 und 80 mit einer Übersichtsfärbung angefärbt. Wir wählten dafür die „Periodic Acid Schiff Reaction Method“ (PAS) - Färbung, die nach standardisiertem Protokoll (Poly Scientific R&D Corp., New York, USA) erfolgte. Dabei wurden die Schnitte zunächst für 10 Minuten unter destilliertem Wasser hydriert. Als nächstes gab man für 5 Minuten 0,5% Perjodsäure-Lösung auf die Objektträger mit anschließend erneut 10-minütiger Waschung unter fließendem destilliertem Wasser. Schiff'sche Reagenz wird für weitere 15 Minuten auf die Proben gegeben, danach erfolgt ein weiterer 10-minütiger Waschschrift mit destilliertem Wasser. Im nächsten Schritt wird Hämalaun für 5 Minuten eingesetzt und im Anschluss erneut für 10 Minuten gewaschen. Daraufhin gibt man 1%ige Lithiumcarbonat-Lösung zur Blaufärbung hinzu und wäscht die Schnitte sofort für 5 Minuten unter fließendem Wasser. Daraufhin gibt man die Schnitte in eine Verdünnungsreihe aus konzentrierter werdendem Ethanol (10 Minuten 70%, 10 Minuten in 90%, 10 Minuten in 100%) und anschließend für 10 Minuten in Dimethylbenzene (Xylene). Anschließend können die Objektträger mit Fluoromount (MERCK-Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt und mit Deckgläsern (DK 50, 24*50mm, A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland) versorgt werden.

2.6.5 Histologische Auswertung

Die histologische Auswertung der Färbungen erfolgte am konfokalen Mikroskop IX81 (Olympus, Shinjuku, Tokio, Japan), ausgestattet mit einem FV1000 Confocal Laser Scanning System, einem FVD 10 SPD Spektral-Detektor und Dioden-Laser in den Anregungswellenlängen 405, 495, 550 und 635 nm. Zur Auswertung der Fluoreszenz wurden Aufnahmen mit Objektiven Olympus UPLFLN 40x Öl (numerische Apertur 1.3), sowie 60x

Ölimmersionsobjektiv verwendet. Die verwendeten Anregungslaserwellenlängen entsprachen dabei 405 nm (DAPI), sowie dem Wellenlängenbereich des mit Fluoreszenz markierten Sekundärantikörpers (635 nm bei Alexa 647). Zusätzlich wurden Durchlichtaufnahmen mit den gleichen Objektiven angefertigt. Alle Aufnahmen wurden im Anschluss von den Aufnahmegeräten exportiert und, wenn notwendig, mit FIJI (Schindelin, Arganda-Carreras et al. 2012) und/ oder Photoshop Elements (2020, Adobe Systems Inc., San Jose, USA) nachbearbeitet (optimale horizontale Ausrichtung der Aufnahmen; Kontrastverstärkung; Intensivierung der Farben).

2.6.6 Korrelation der multimodalen Aufnahmen

Anhand auffälliger Gewebestrukturen („Landmarks“) konnten die oben beschriebenen multimodalen Aufnahmen eines Auges exakt untereinander korreliert werden. So stellten z.B. die Lage retinaler Gefäße, größere Drusen und Pseudodrusen auffällige und auffindbare Strukturen dar, die sowohl in der *in vivo* als auch der *ex vivo* und der histologischen Bildgebung darstellbar waren. Hilfreich war hierbei, dass das Gewebe vor Einbettung exakt unter dem Mikroskop ausgerichtet wurde, so dass eine bestmögliche horizontale Justierung gewährleistet war. Gleichzeitig wurde bei der Anfertigung der Kryoschnitte exakt die Fovea bestimmt und die Abstände der einzelnen Schnitte zur Fovea dokumentiert. Die Kryoschnitte wurden unter ständiger lichtmikroskopischer Kontrolle angefertigt und parallel mit den *in vivo* und *ex vivo* Aufnahmen verglichen.

2.7 Statistik

Die statistische Auswertung der Anzahl der Bulbi mit und ohne Pathologie und der Entnahmezeiten zwischen Tod und Fixierung (Death-to-Preservation-Time) erfolgte mithilfe von Microsoft Excel (Version 2019, Microsoft Corporation, Albuquerque, USA). Es wurden jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die Beurteilung der CNTF-Färbungen erfolgte nach rein qualitativen Gesichtspunkten (Anfärbbarkeit und Lokalisation retinaler Strukturen).

3. Ergebnisse

3.1 Überblick

Der Aufbau eines geeigneten Systems an der Augenklinik Würzburg zur *in vivo/ ex vivo* Korrelation beinhaltet:

- Organisation der technisch-methodischen Voraussetzungen
- Präoperative Bildgebung (*in vivo*)
- Logistischer Ablauf im OP
- Probenverarbeitung
- Postoperative Bildgebung (*ex vivo*)
- Histologische Aufarbeitung des Gewebes und mikroskopische Aufnahmen.

Dieser Aufbau konnte erfolgreich etabliert und an einer menschlichen Bulbusspende angewendet werden (Abbildung 5). Hierbei handelte es sich um einen 68-jährigen Kaukasier mit stark schmerzhaftem rubeotischen Sekundärglaukom bei Z.n. retinalem Zentralarterienverschluss. Dies hatte im Verlauf zur vollständigen Erblindung geführt. Bei zunehmend schmerzhaftem Auge bestand der patienteneigene Wunsch zur elektiven Eucleatio bulbi.

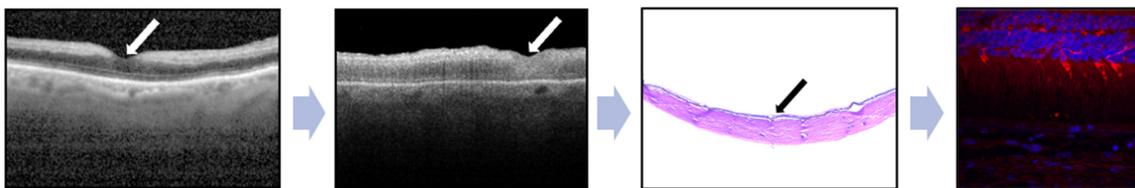


Abbildung 5: **Exemplarischer, etablierter Arbeitsablauf an der Augenklinik des UKW** (von links nach rechts). *In vivo* OCT, Schnitt durch die zentrale Retina (weißer Pfeil markiert Fovea); *Ex vivo* OCT, Schnitt durch die zentrale Retina (weißer Pfeil markiert Fovea); Histologischer Schnitt mit PAS-Färbung (schwarzer Pfeil markiert Fovea); CNTF-Färbung; CNTF = Ciliary Neurotrophic Factor; OCT = Optische Kohärenztomographie; PAS = Periodic Acid Schiff Reaction Method; UKW = Universitätsklinikum Würzburg.

Im Folgenden werden die *in vivo* (präoperativen) Aufnahmen beschrieben (Abbildung 6/7), die einen Tag vor Enukleation angefertigt wurden.

3.2 *In vivo* multimodale retinale Bildgebung

Im Rahmen der präoperativen *in vivo* Bildgebung wurden Fotografien des vorderen und hinteren Augenabschnittes angefertigt. Im Vorderabschnitt zeigte sich eine deutliche gemischte Bindehautinjektion. Der Einblick war aufgrund einer Hornhautdekomensation bei rubeotischem Sekundärglaukom mit reduzierter Mydriasis eingeschränkt, was die Bildqualität etwas beeinträchtigte (Abbildung 6).

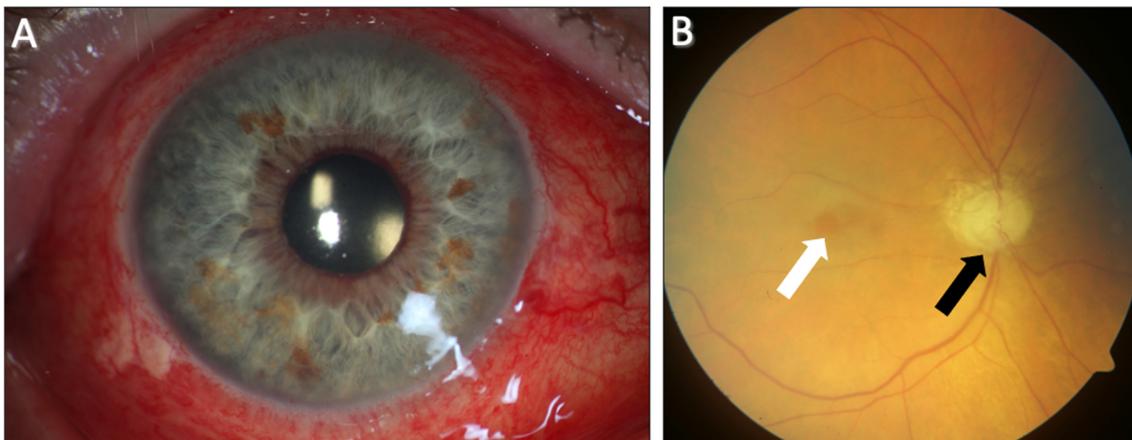


Abbildung 6: **Präoperative *in vivo* Bildgebung.** Der vordere Augenabschnitt (A) des rechten Auges weist eine gemischte Injektion der Bindehaut, ein Hornhautödem und eine Rubeosis iridis auf. Die Farbfundusfotografie (B) zeigt eine zum Teil blasse Netzhaut und eine Atrophie des Nervus Opticus (schwarzer Pfeil). Der weiße Pfeil markiert die Fovea.

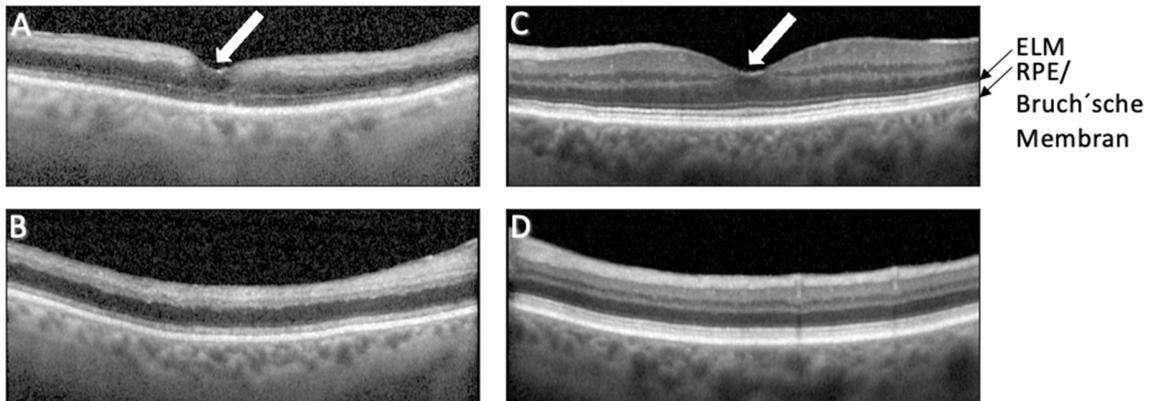


Abbildung 7: **Präoperative *in vivo* SD-OCT-Bildgebung.** Horizontale SD-OCT-Aufnahme durch die Makula (A) und superior parafoveal (B) des rechten Auges mit Atrophie der inneren und äußeren Netzhautschichten bzw. kaum abgrenzbaren Netzhautschichten. Pfeil: Fovea. Zum Vergleich: Das gesunde Partnerauge weist sowohl in den SD-OCT-Aufnahmen durch die Fovea (C) als auch im Bereich der Parafovea (D) ein regelrechtes Reflexionsmuster und eine reguläre Netzhautschichtung auf; ELM = Externe Limitierende Membran, RPE = Retinales Pigmentepithel, SD-OCT = Spectral Domain – Optische Kohärenztomographie.

3.2.1 Farbfundusfotografie

Funduskopisch zeigte sich eine atrophe Netzhaut, mit engen retinalen Gefäßen, insbesondere im Bereich der Papille. Die Netzhaut war im Bildausschnitt ubiquitär anliegend. Die Papille stellte sich blass, aber randscharf begrenzt mit einer hochovalen Exkavation von 0,8 dar. Die Exkavation erklärt sich durch das vorhandene Sekundärglaukom (Abbildung 6).

3.2.2 SD-OCT

Die Qualität der präoperativ aufgenommenen SD-OCT war, ebenso wie bereits die Farbfundusfotografie, aufgrund der Hornhautdekomensation eingeschränkt. Trotzdem konnte erfolgreich ein Ausschnitt von 20x20° mit Zentrierung auf die Fovea aufgenommen werden. Dabei zeigte sich eine insgesamt reduzierte Netzhautdicke, sowohl zentral als auch parafoveal, was als Folge des Zentralarterienverschlusses gewertet werden kann. Außerdem fällt eine dünne Choriokapillaris auf. Gut abgrenzbar stellt sich allerdings die foveale Senke dar. Im Bereich der äußeren Retina sind weiterhin einige hyperreflektive Banden abgrenzbar. Besonders deutlich ist hierbei die Externe Limitierende Membran (ELM) hervorzuheben, die sich stark hyperreflektiv darstellt (Abbildung 7).

Zum Vergleich: Präoperativ wurde *in vivo* ebenso das gesunde, unauffällige Partnerauge untersucht. Im direkten Vergleich imponieren die bessere Aufnahmequalität sowie die regelrechte Netzhautschichtung (Abbildung 7).

Aufgrund des reduzierten Einblicks und der Schwierigkeiten des Patienten zur Fixierung konnten präoperativ keine adäquaten Autofluoreszenz-Aufnahmen angefertigt werden (NIR-AF und BAF).

3.3 Operativer Eingriff

Die Entfernung des rechten Augapfels wurde *lege artis* durchgeführt. Die ursprüngliche Ansatzstelle des Musculus rectus superior wurde dabei mit einem blauen Gewebestift markiert. Postoperative Komplikationen traten keine auf.

Nach erfolgter Eukleation wurde direkt der vordere Augenabschnitt (Hornhaut, Iris, Linse) mittels Trepan (16mm) und Schere abpräpariert. Dabei wurde penibel darauf geachtet, dass keine Manipulation von Glaskörper und Netzhaut erfolgte. Danach konnte der Restbulbus sofort in 4% PFA überführt werden. Die Zeit bis zur Fixierung lag dabei unter 5 Minuten, wodurch eine sehr gute Gewebeerhaltung garantiert war. Der Bulbus verblieb dann für 24 Stunden im Fixans.

3.4 *Ex vivo* multimodale retinale Bildgebung

Durch die oben erwähnte Blau-Markierung am superioren Bulbus wurde die Orientierung beim Mikroskopieren und im Gewebehalter erleichtert.

Nach entsprechender Ausrichtung unter dem Dissektionsmikroskop erfolgte die Farbfundusfotografie. Hier lassen sich der Nervus Opticus, die retinalen Gefäße und die Makula gut darstellen. Der Sehnerv zeigt sich hier atroph, die retinalen Gefäße eng. Der Einblick ist im Vergleich zur *in vivo* Farbfundusfotografie aufgrund des fehlenden Vorderabschnittes deutlich verbessert. Nach anterior zeigt sich eine geringe Ablösung der

Netzhaut. Dies entspricht einem *ex vivo* entstandenen Präparations-Artefakt. Aufgrund der sorgfältigen Probenaufbereitung waren diese Artefakte jedoch minimal (Abbildung 8).

Für die Darstellung des Bulbus und der *ex vivo* Bildgebung wurde eigens ein Bulbushalter angefertigt, der eine Aufnahme an den gleichen Geräten wie für die *in vivo* Aufnahmen ermöglichte (Abbildung 9).

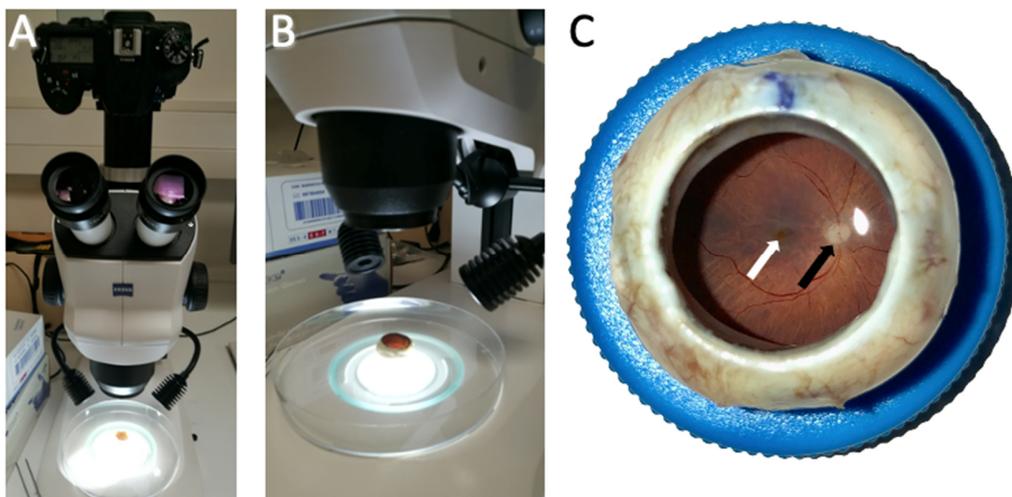


Abbildung 8: **Multimodale postoperative *ex vivo* Bildgebung.** **A:** Aufbau des Dissektionsmikroskops; **B:** Bulbus unter dem Dissektionsmikroskop: *Ex vivo* Fundusfotografie; **C:** Bulbus nach Abpräparation des vorderen Augenabschnittes, blaue Markierung superior; Darstellung Nervus Opticus (schwarzer Pfeil) und Fovea (weißer Pfeil), aufgenommen mit dem Dissektionsmikroskop.

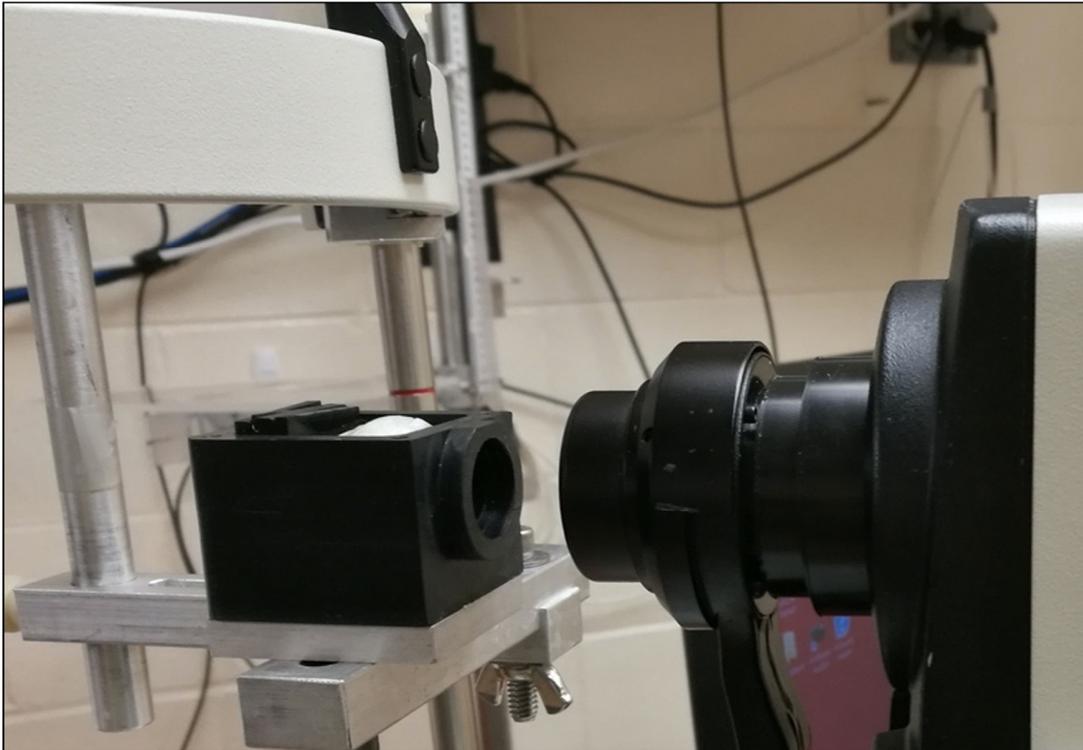


Abbildung 9: **Aufbau für die multimodale postoperative *ex vivo* Bildgebung.** Befestigung des Bulbus im Augenhalter an Stirnvorrichtung zur cSLO (Confocal Scanning Laser Ophthalmoscopy; Spectralis, Heidelberg Engineering, Heidelberg, Deutschland).

3.4.1 *SD-OCT*

Hierbei wurde der identische OCT-Schnitt durch die Fovea ausgewählt, um die Korrelation zwischen den *in vivo* und *ex vivo* Aufnahmen zu ermöglichen. Deutlich ersichtlich ist auch hier die bessere Bildqualität (Abbildung 10/11). Dies ist auf den fehlenden pathologischen Vorderabschnitt zurückzuführen. Erneut ist die ELM als hyperreflektives Band in der äußeren Retina prominent. Die inneren Netzhautschichten sind atroph. Gleichzeitig zeigen sich die einzelnen retinalen Schichten etwas schlechter, aber immer noch abgrenzbar.

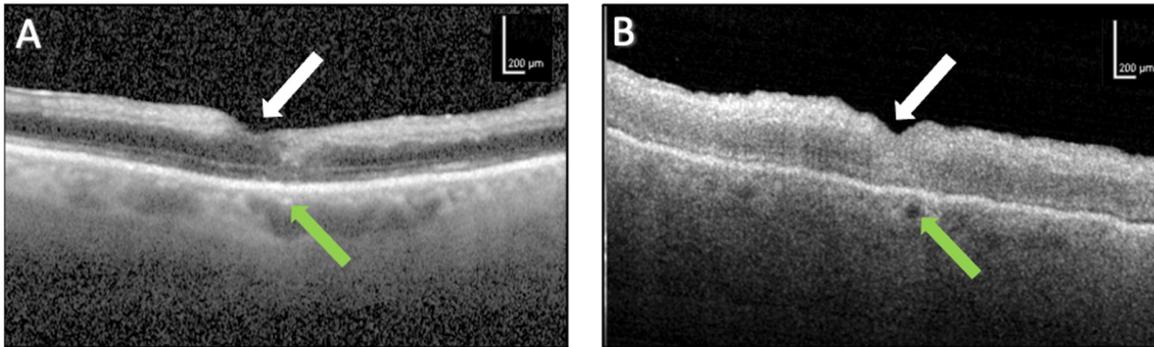


Abbildung 10: **Korrelation der *in vivo*/ *ex vivo* OCT: Fovea.** **A:** Schnitt durch die zentrale Fovea *in vivo*. Darstellung der fovealen Senke (weißer Pfeil); Anschnitt eines choroidalen Gefäßes (grüner Pfeil); Retinale Schichten gut abgrenzbar; **B:** Korrelierter Schnitt durch die zentrale Fovea *ex vivo*. Nach Entfernung des vorderen Augenabschnittes deutlich verbesserter Einblick; Auch *ex vivo* Abgrenzbarkeit retinaler Schichten durch beginnende Umbauprozesse; Foveale Senke markiert (weißer Pfeil); Anschnitt des in A ebenfalls markierten choroidalen Gefäßes (grüner Pfeil); OCT = Optische Kohärenztomographie.

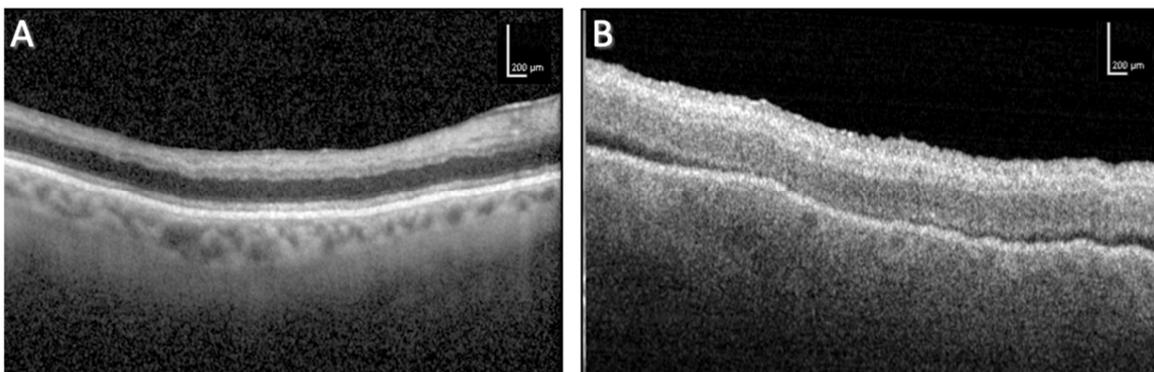


Abbildung 11: **Korrelation der *in vivo*/ *ex vivo* OCT: Parafovea.** **A:** Suprafovealer OCT-Schnitt *in vivo*. **B:** Korrelierter, suprafovealer OCT-Schnitt *ex vivo*. Beginnende Ablatio retinae im Bereich der Schnittränder als *ex vivo* entstandenes Artefakt. Auch *ex vivo* lassen sich einzelne Netzhautschichten gut gegeneinander abgrenzen. OCT = Optische Kohärenztomographie.

3.4.2 Fundusautofluoreszenz

Ex vivo wurden BAF- und NIR-Autofluoreszenz aufgenommen (Abbildung 12). In der BAF zeigten sich Hypoautofluoreszenzen im Bereich des Sehnervs sowie der Gefäße. Hypoautofluoreszierend zeigte sich zudem das Zentrum der Makula, da die Autofluoreszenz des RPEs durch das Makulapigment in den Müller-Zellen und Photorezeptoren abgeschirmt wird. Im NIR-AF-Bild ist der Sehnerv dagegen hyperautofluoreszierend. Der weitere hintere Pol (außerhalb der hypoautofluoreszierenden Fovea und Parafovea) ist hyperautofluoreszierend (Abbildung 12).

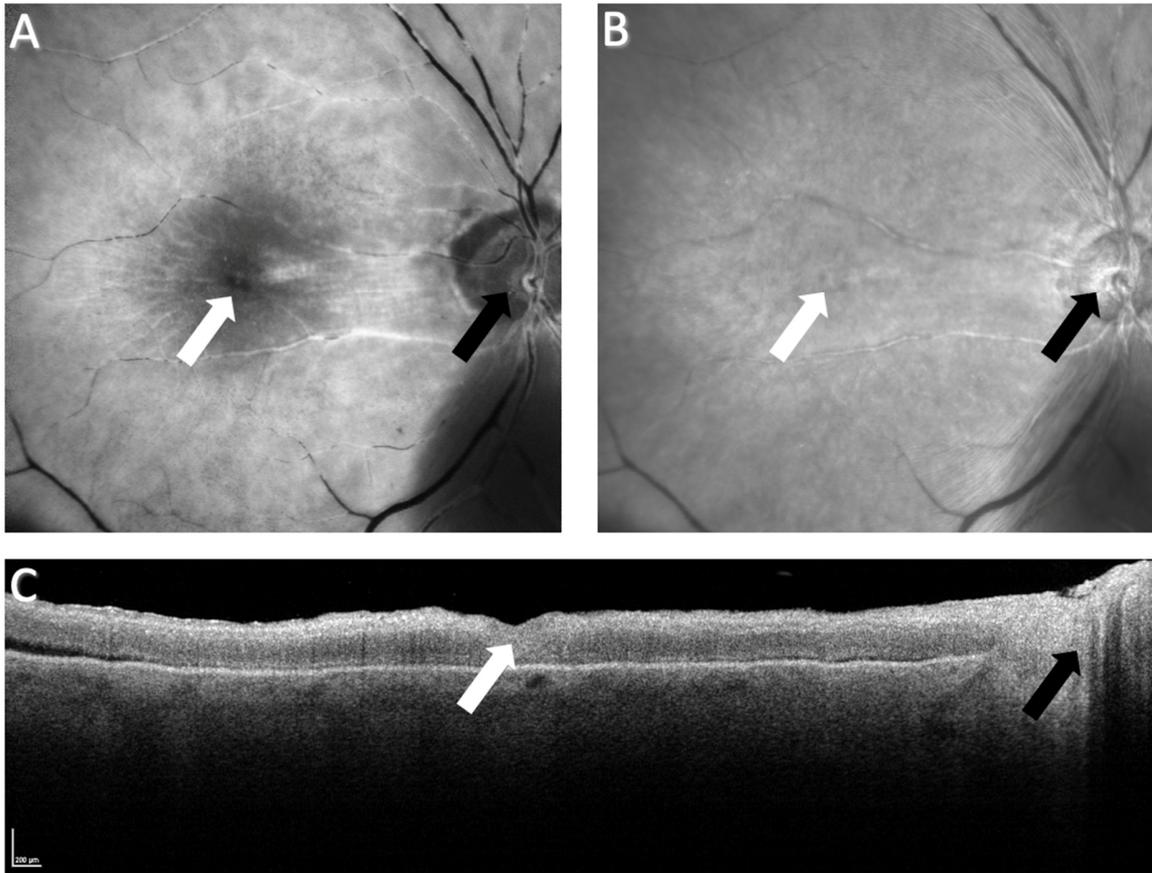


Abbildung 12: **Multimodale postoperative ex vivo Bildgebung: Fluoreszenz.** **A:** BAF en face (Fovea: weißer Pfeil; Sehnerv: schwarzer Pfeil); **B:** NIR-Autofluoreszenz en face (Fovea: weißer Pfeil; Sehnerv: schwarzer Pfeil); **C:** SD-OCT durch einen zentralen Schnitt; Fovea mit weißem Pfeil markiert; Sehnerv am rechten Bildrand angeschnitten (schwarzer Pfeil); BAF = Blau-Autofluoreszenz; NIR = Nah-Infrarot; SD-OCT = Spectral Domain – Optische Kohärenztomographie.

3.5 Histologische Beurteilung

Im Anschluss an die *ex vivo* Bildgebung erfolgte die Einbettung und histologische Aufarbeitung. Von jeweils 4 Objektträgern (Schnitte 21, 40, 61, 80) wurde eine PAS-Färbung angefertigt, um die Orientierung im umgebenden Gewebe zu erleichtern. Die äußere und innere Körnerzellschicht zeigten am hier demonstrierten Beispiel erwartungsgemäß eine blaue Anfärbung, während das RPE dunkelrot erschien. Die weiteren Schichten färbten sich in verschiedenen Nuancen von rosa bis violett. Die inneren Netzhautschichten sind deutlich

in ihrer Schichtdicke herabgesetzt, was der durch die retinalen Ischämie bedingten Atrophie der Netzhaut entspricht (Abbildung 13).

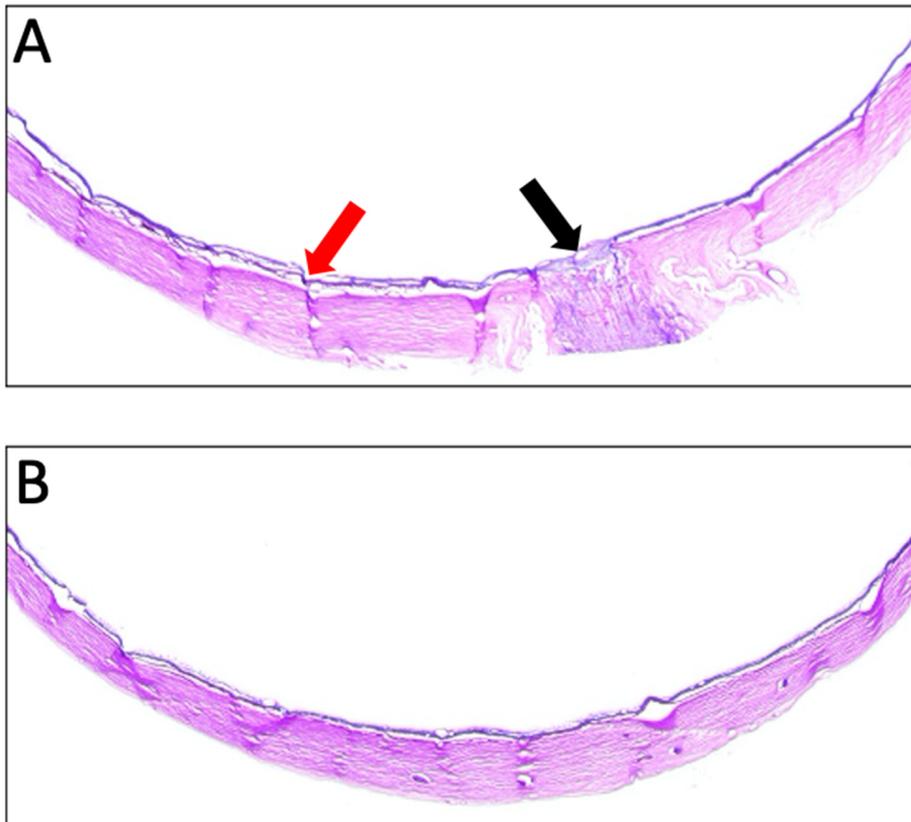


Abbildung 13: **Histologische Übersichtsfärbung mit PAS**, aufgenommen mit dem Dissektionsmikroskop; **A**: Zentraler Schnitt durch die Fovea (roter Pfeil) und den N. Opticus (schwarzer Pfeil); **B**: Schnitt durch die Parafovea; PAS = Periodic Acid Schiff's Reaction.

3.6 Korrelation von *in vivo* und *ex vivo* Bildgebung

Die Korrelation der *in vivo* und der *ex vivo* Bildgebung wurde im genannten Gewebe anhand von Gefäßen und definierten Entfernungen, die sowohl bildmorphologisch als auch histologisch exakt bestimmt werden konnten, durchgeführt. Definierte Punkte waren dabei die Makula mit der fovealen Grube und der Sehnerv, die als Orientierung dienten (Curcio, Medeiros et al. 1998).

An diesem sowie an identisch gewonnenen und vorbereiteten Geweben aus einem Parallelprojekt konnte dann der immunhistochemische Nachweis zur Lokalisation von CNTF in der humanen Retina erbracht werden.

3.7 Spendergewebe des Advancing Sight Network

Im Rahmen dieser Studie konnten 94 Spenderaugen (n=94) aus einem Kooperationsprojekt Ach-Curcio, die auf identische Weise wie das oben dargestellte Spenderauge vorbereitet wurden, verwendet werden. Es handelte sich dabei ausschließlich um rechte Bulbi. Davon lag bei 37 Augen (39,4 %) nach der oben beschriebenen Klassifikation eine AMD vor (Curcio, Medeiros et al. 1998). Bei weiteren 10 Augen (10,6 %) handelt es sich um fragliche Veränderungen durch AMD. Bei 7 Augen (7,4 %) wurden andere, nicht weiter klassifizierte Pathologien nachgewiesen. Bei einem Auge (1,1 %) wurde keine Auswertung vorgenommen. Die restlichen 39 Augen (41,5 %) wurden als unauffällig beschrieben. Die Death-to-Preservation time lag dabei anfangs bei durchschnittlichen 4,4 Stunden und reduzierte sich im Verlauf der Probengewinnung auf 3,5 Stunden.

Tabelle 1: **Gegenüberstellung der Spenderaugen und vergleichender Arbeitsablauf.** Enukleation an der Augenklinik des Universitätsklinikums Würzburg und durch das Advancing Sight Network; „+“ entspricht durchgeführtem Arbeitsschritt; „-“ entspricht nicht durchgeführtem Arbeitsschritt; Entnahmezeit entspricht der Zeit zwischen Tod/ Durchtrennung der Blutversorgung bis zur Überführung in das Fixans.

Methoden/Ort	Augenklinik, Universitätsklinikum Würzburg	Advancing Sight Network/ Labor Dr. Curcio
<i>In vivo</i> multimodale Bildgebung	+	-
Entnahme	+	+
<i>Ex vivo</i> multimodale Bildgebung	+	+
Histologie	+	+
Mikroskopie	+	+
Entnahmezeit	< 5 Minuten	3 – 6,5 Stunden, Mittel: 3,5 h

3.8 Immunhistochemie CNTF

Die Färbungen erfolgten sowohl an gesunden Augen als auch bei früher und später AMD (neovaskuläre AMD, geographische Atrophie). Die Anfärbungen waren insgesamt schwierig zu realisieren und benötigten sorgsame Anpassung der Methoden.

CNTF zeigte in unseren Versuchen ein starkes Signal im Bereich der Fotorezeptoraußensegmente. Auffallend ist dabei die zunehmende Signalintensität bei Progression der Erkrankung. Insbesondere bei neovaskulärer AMD zeigt sich dort eine deutliche CNTF-Anfärbung. An Augen mit geographischer Atrophie waren zudem auch Anfärbungen im Bereich der äußeren Körnerzellschicht und schwach auch im Bereich des Endothels der Choriokapillaris zu finden. Im histologisch unauffälligen Auge ist dagegen keine CNTF Anfärbung erkennbar. Die Negativkontrollen zeigten keine Anfärbungen (siehe Abbildung 14).

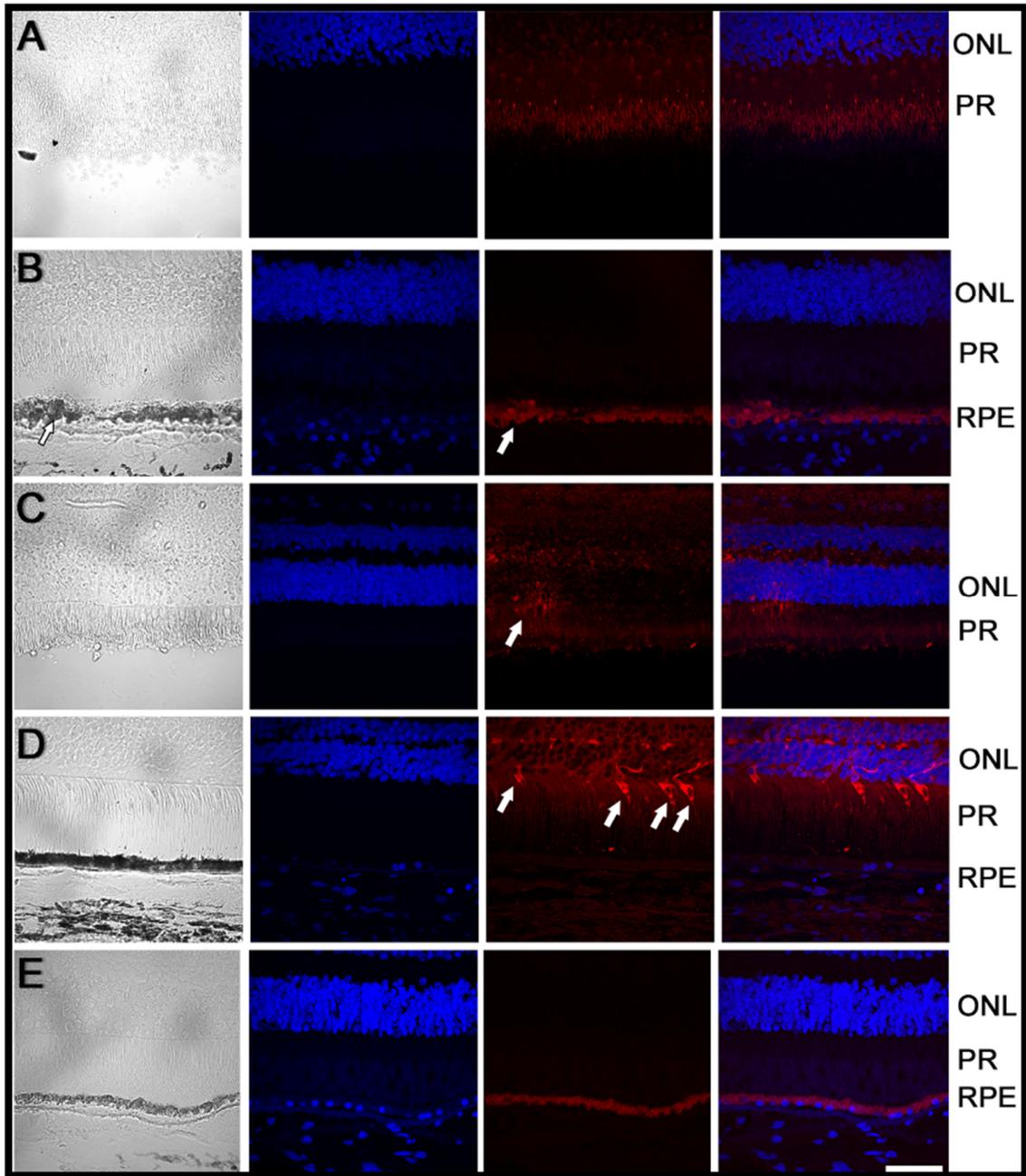


Abbildung 14: **Anfärbung humaner Retina mit CNTF-Immunfluoreszenzfärbung.** Nachweis von zunehmender Anfärbung im Bereich der Fotorezeptoraußensegmente (Pfeile) am pathologischen Auge. **A:** unauffälliger Bulbus: Keine Anfärbung; **B:** Frühe AMD: Schwache Anfärbung im Bereich der Fotorezeptoren; **C:** Geographische Atrophie; Anfärbung im Bereich der Äußeren Körnerzellschicht; **D:** Neovaskuläre AMD; Starke Anfärbung im Bereich der Fotorezeptor-Außensegmente; **E:** Negativ-Kontrolle; Keine Anfärbung; Hyperreflektives RPE bei Anregung mit 635nm; AMD = Altersbedingte Makuladegeneration; ONL = Äußere Körnerzellschicht; PR = Fotorezeptoren; RPE = Retinales Pigmentepithel.

4. Diskussion

Ziel dieser „Proof of concept Study“ war der Aufbau eines Systems zur Korrelation von *in vivo* und *ex vivo* multimodal retinaler Bildgebung mit der entsprechenden Histologie. Dies konnte erfolgreich an einem Spenderauge gezeigt werden. Zudem konnte die praktische Anwendung und der Nutzen einer größeren Anzahl an Augenspenden auch für erste wissenschaftliche Fragestellungen demonstriert werden.

Korrelationen zwischen *in vivo*/ *ex vivo* Aufnahmen sind in mehrfacher Hinsicht wichtig: sie erlauben u.a. den direkten Vergleich multimodaler Bildgebung mit anderen Techniken, wie z.B. der Histologie, Immunhistochemie oder Elektronenmikroskopie, ermöglichen neuen Erkenntnisgewinn zu den Gegebenheiten in normalem Gewebe oder bei pathologischen Veränderungen und können für die Validierung auch neuer Darstellungstechniken herangezogen werden.

4.1 Notwendigkeit der *in vivo* - *ex vivo* Korrelation

In den letzten 20 Jahren wurde die multimodale Bildgebung insbesondere in der klinischen Ophthalmologie zu einem wichtigen Instrument der Diagnostik und Verlaufskontrolle. Viele Autoren erkannten aber auch die Notwendigkeit der Korrelation von neuen Techniken mit dem Goldstandard, der Histologie (Dawson, Holley et al. 2005, Ferguson, Grover et al. 2014). Durch die Zunahme an Erkenntnissen aus Korrelationsstudien können Therapieentscheidungen fundierter getroffen werden, weil *in vivo* ein besseres Verständnis für die zugrundeliegende Histologie besteht.

4.1.1 Methodische Unterschiede

Die Bedeutung multimodaler Korrelationsstudien in der Augenheilkunde hat sich bereits in mehreren Studien gezeigt, sowohl in Tiermodellen als auch beim Menschen. Im Rahmen dieser Arbeit wird ein Aufbau präsentiert, der die Korrelation von *in vivo* mit *ex vivo* Bildgebung und der zellulären/subzellulären Weiterverarbeitung ermöglicht. In der Literatur

wurden bereits zahlreiche Beispiele beschrieben, mit jedoch insbesondere methodischen Unterschieden zum vorliegenden Aufbau. Vielfach wurde nur die *in vivo* Bildgebung mit der Histologie (Chen, Cense et al. 2006, Xie, Zhao et al. 2018) oder die *ex vivo* Bildgebung mit der Histologie verglichen (Velthoven, Willekens et al. 2004, Ghazi, Dibernardo et al. 2006, Ghazi and Knape 2006). Dadurch wird die exakte Korrelation erschwert. Die Notwendigkeit der Korrelation wurde jedoch durchgehend erkannt.

Gloesmann et al. verglichen die *ex vivo* OCT mit der Histologie am Schweineauge bereits 2003 (Gloesmann, Hermann et al. 2003). Bulbi wurden entweder von lebenden Schweinen enukleiert oder zeitnah post mortem entnommen. Damit war eine kurze Death-to-Preservation-Time gewährleistet. Methodisch lag ein ähnlicher Aufbau vor. Die Korrelation erfolgte ebenfalls maßgeblich anhand von Gefäßen und Pathologien. Allerdings fehlte der wichtige Vergleich mit der *in vivo* retinalen Bildgebung. Hier konnten nur die post mortem/nach Entnahme entstandenen Aufnahmen miteinander verglichen werden. Damit kann eine echte Korrelation zur *in vivo* Bildgebung nur erschwert hergestellt werden, da post mortem zügig Veränderungen eintreten.

Anger und Kollegen hatten in ihren Untersuchungen an Affen ebenfalls die Notwendigkeit der Korrelation von bildgebenden Verfahren mit der Histologie erkannt. Jedoch wurde in ihrer Arbeit nur mit *in vivo* OCT-Aufnahmen verglichen. Es fehlt hier also der wichtige Zwischenschritt der *ex vivo* Bildgebung (Gloesmann, Hermann et al. 2003, Anger, Unterhuber et al. 2004).

Nach einigen weiteren Vorarbeiten am Tier, konnten 2005 die ersten Korrelationen zwischen *ex vivo* OCT und Histologie am Menschen durchgeführt werden. Ghazi et al postulierten ein histologisches Korrelat zur äußeren Bande in der OCT: ein Komplex aus RPE, Basalmembran und innerer Choroidea (Ghazi, Dibernardo et al. 2005). Seit 2006 sind dann auch erste Korrelationsstudien mit menschlichem Gewebe durchgeführt worden. Dabei wurden meist Bulbi verwendet, die aufgrund einer Tumorerkrankung der Orbita zur Exenteratio orbitae vorgesehen waren. Hier bestätigte sich, dass die plexiformen retinalen Schichten in der Histologie sich als hyperreflektive Banden in der OCT darstellen, die nukleären Schichten jedoch hyporeflektiv sind. Die Zeit zwischen *in vivo* OCT und Exenteratio lag hier bei maximal 3 Stunden (Chen, Cense et al. 2006).

4.1.2 Korrelation andere Fachgebiete

Somit wurde bereits gezeigt, dass Korrelationsstudien von *in vivo* und *ex vivo* multimodal bildgebenden Untersuchungen durchgeführt werden können, auch an menschlichem Gewebe. Eine sich daran anschließende histologische Untersuchung trägt zu weiterem Verständnis und Verbesserungen in der Diagnostik und Therapie bei. Dazu gibt es zahlreiche Beispiele auch aus verschiedenen medizinischen Fachdisziplinen: Zum Beispiel wurde die Optische Kohärenztomographie auch für dermatologische Fragestellungen entdeckt. Dadurch kam es zu einer deutlichen Verbesserung der nicht-invasiven Diagnostik von unter anderem Basalzellkarzinomen. Die optische Kohärenztomographie erlaubt eine *in vivo* Tumordiagnostik basierend auf Veränderung der Morphologie und Dicke der Epidermis und oberen Dermis und gehört heutzutage zur dermatologischen Diagnostik dazu (Bechara, Gambichler et al. 2004). Auch für eine andere dermatologische Erkrankung, das Maligne Melanom, wurden Korrelationen zwischen der Tumordicke in der *ex vivo* OCT und der Histologie durchgeführt. Die gemessene Dicke war dabei in der Korrelation sehr ähnlich, sodass die Autoren schlussfolgerten, dass anhand der in der *in vivo* OCT abgeschätzten Tumordicke bereits präoperativ eine Therapieplanung erfolgen kann (Hartmann, Krammer et al. 2016).

Weitere Anwendungsgebiete der Korrelation von *in vivo* Bildgebung mit der Histopathologie sind z.B. pädiatrische Hirntumore (Uhl, Althoefer et al. 2002), Gelenkuntersuchungen (Larheim, Westesson et al. 1999, Puhakka, Melsen et al. 2004), Liposarkome (London, Kim et al. 1989) oder Psoriasis vulgaris (Morsy, Kamp et al. 2010). Trotz häufig auftretender methodischer Schwierigkeiten, wie der Gewebegewinnung und der exakten Korrelation, werden aufgrund des Informationsgewinns auch heute noch zahlreiche Korrelationsstudien durchgeführt.

4.1.3 Korrelation Augenheilkunde

Durch die Korrelation der OCT und weiterer Bildgebung mit der Histologie entstanden auch in der Ophthalmologie entscheidende Erkenntnisse: Von der *in vivo* gemessenen Retinadicke konnte direkt auf die Dicke des Gewebes in der Histologie geschlossen werden (Ferguson,

Grover et al. 2014). Dies ist insbesondere interessant für die Untersuchung der physiologischen Schichtdickenänderung der normal alternden Retina (Vajzovic, Hendrickson et al. 2012). Daraus ergibt sich die Möglichkeit des Vergleichs physiologischer Alterserscheinungen mit pathologischen Veränderungen und deren Verlaufskontrolle. Im Rahmen der Diagnostik, z.B. des Aderhautmelanoms, wurden durch die *in vivo* Bildgebung deutliche Fortschritte für die Diagnosestellung erreicht. Zum einen können funduskopisch noch nicht sichtbare Tumore entdeckt werden. Zum anderen können auch choroidale Vorstufen von malignen Veränderungen identifiziert und in der Konsequenz entsprechend adäquat behandelt werden (Davila and Mruthyunjaya 2019).

Für die diabetische Retinopathie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die frühzeitige multimodale Bildgebung ein zeitiges Erkennen von Progressionsfaktoren und ein besseres Verständnis der Erkrankung ermöglicht (Sacconi, Casaluci et al. 2019).

Insbesondere für die AMD spielt die OCT im Rahmen von Diagnostik und Verlaufskontrollen eine entscheidende Rolle. Durch diverse histologische Korrelationen konnte ein besseres Verständnis für die Erkrankung erworben (Li, Dolz-Marco et al. 2018), Prognosefaktoren identifiziert und ideale Therapiezeitpunkte damit besser angepasst werden (Balaratnasingam, Messinger et al. 2017). Zudem konnten spezifische Pathologien klassifiziert werden, die *in vivo* bereits früh auf eine AMD hinweisen (Curcio, Messinger et al. 2013).

Die Korrelationsstudien helfen auch dabei, Artefakte in ihrer tatsächlichen Ausdehnung in der OCT richtig einzuordnen, die z.B. durch Photokoagulation der Netzhaut entstehen (Koinzer, Saeger et al. 2013).

Oben genannte Beispiele zeigen, welche wichtige Erkenntnisse aus der Korrelation multimodal bildgebender Verfahren gewonnen wurden. Auch fast 20 Jahre nach der ersten Korrelationsstudie am Menschaugen ist die Forschung diesbezüglich noch nicht abgeschlossen. Trotzdem bestehen auch heute noch methodische Schwierigkeiten, die sich insbesondere durch die geringe Verfügbarkeit menschlichen Gewebes ergeben.

Nach wie vor bieten die in neuen bildgebenden Verfahren entdeckten Pathologien die Möglichkeit, ein besseres Verständnis für die Pathogenese von Erkrankungen zu entwickeln.

Außerdem können durch die Kenntnis von histopathologischen Korrelaten der in der *in vivo* Bildgebung gefundenen Auffälligkeiten, *in vivo* quasi „histologische“ Auswertungen der Retina erfolgen. Dies erleichtert und verbessert die Diagnosestellung und die Verlaufskontrolle. Daher hat es bis heute nichts an Aktualität verloren, einen Arbeitsablauf zu designen, der effiziente und standardisierte Korrelationen ermöglicht.

4.1.4 Korrelation in dieser Arbeit

Die strukturierte Korrelation zwischen *in vivo* und *ex vivo* retinaler Bildgebung mit der Histologie stellt den Anwender allerdings vor Herausforderungen. So folgt die menschliche Netzhaut einem sehr strukturierten horizontalen und vertikalen Aufbau. Dadurch können schon kleine Abweichungen in der Rotation zu deutlichen Fehl-Korrelationen und - Interpretationen führen. Als hilfreiche Anhaltspunkte für die manuelle Korrelation erwiesen sich dabei Strukturen, an denen sich der Untersucher orientieren kann, wie z.B. Drusen, Gefäße oder die Fovea.

Für die Korrelation zwischen *in vivo* und *ex vivo* Bildgebung am selben Gerät bestehen außerdem die Möglichkeiten von „*Follow up*“-Untersuchungen an der exakt gleichen Stelle der Erstaufnahme (z.B. präoperativ) und „Eye Tracking“ (Mehrfachaufnahmen und Mittelungen der Signale an einem Ort) am SPECTRALIS (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Deutschland). Dadurch erfolgt eine automatisierte, exakte Korrelation, die *in vivo* besonders wichtig für die Verlaufskontrolle von Erkrankungen ist und im hier gezeigten Ablauf eine nahezu perfekte Korrelation ermöglicht. Einschränkend ist, dass bei der *in vivo* – *ex vivo* Korrelation der Bulbus *ex vivo* bei post mortem entstandenen Artefakten teilweise nicht als identisch erkannt wird und so keine automatische Korrelation erfolgen kann.

Für die Korrelation mit der Histologie ist außerdem die Bestimmung der exakten Ausrichtung der OCT-Aufnahmen und der histologischen Schnitte essenziell. Dafür wurde das Zentrum der Fovea als Fixpunkt in der Netzhaut bestimmt und von hier aus alle Schnitt- und Aufnahmeparameter festgelegt. Damit konnte retrospektiv eine genau Landkarte der histologischen Schnitte erstellt werden. Unterstützend kann sich zusätzlich auch hier an „Landmarks“ wie Gefäßgabelungen, auffällige Gefäßzeichnungen oder ggf. vorhandene Pathologien orientiert werden. Insgesamt kann hiermit die Histologie sehr konkret mit den

bildgebenden Verfahren korreliert werden. Für die histologische Einbettung wurden die Proben möglichst exakt unter dem Mikroskop ausgerichtet und schockgefrostet. Trotz aller Vorkehrungen sind kleinere Fehlrotationen auch hier nicht komplett auszuschließen. Eine zusätzliche Korrelation der Netzhautdicke könnte zu einer noch exakteren Gegenüberstellung führen.

Die Aufnahmen können je nach Fragestellung sinnvoll mit weiteren bildgebenden Modalitäten kombiniert werden. Beispielsweise bieten Hersteller von eSLO (z.B. Spectralis, Heidelberg Engineering, Heidelberg) bereits Möglichkeiten zur Kombination mit einer OCT-Angiographie an, um nicht-invasiv den Blutfluss in den Netzhautgefäßen und choroidalen Gefäßen darzustellen.

4.2 Herausforderung Gewebegewinnung

Elementar für post mortem Untersuchungen ist die zeitnahe Gewinnung des Spendergewebes (Death-to-Preservation-time). Aus Untersuchungen an Mausgewebe ist bekannt, dass bereits eine Verzögerung um 30 Minuten zu einer Veränderung von an Stoffwechselprozessen beteiligten Proteinen führt (Zhu, Yam et al. 2018).

Damit wird verständlich, dass für die Beantwortung wissenschaftlicher Fragestellungen, die sich insbesondere mit Veränderungen auf Protein- oder Molekülebene abspielen, geeignete Gewebe zeitnah gewonnen werden und entsprechende Arbeitsschritte zur Untersuchung etabliert sein müssen.

Eine erfolgreiche Zusammenarbeit mit Gewebebanken und klar definierte wissenschaftliche Ziele haben sich hier als zukunftsführend erwiesen. Beispielhaft konnten Messinger et al. in einer Studie zur *ex vivo* retinalen multimodalen Bildgebung darlegen, wie die „Death-to-Preservation-Time“ (Zeit zwischen Versterben des Patienten und Fixierung des Gewebes) nach Etablierung mit einer Gewebebank zudem noch erfolgreich verkürzt werden kann (Messinger, KlImble et al. 2018).

Diese beinahe perfektionierten Abläufe existieren in Deutschland nicht. Wünschenswert wäre eine Gewebegewinnung unmittelbar nach Sauerstoff- und Nährstoffunterbrechung. Bei dem in der vorliegenden Arbeit gezeigten Beispielaug lag die „Enucleation-to-Preservation-Time“ bei unter 5 Minuten. Dieser Arbeitsablauf ermöglicht also maximal verkürzte Zeitabstände zwischen den zu vergleichenden Aufnahmen (*in vivo*, *ex vivo* und daraus gewonnener Histologie), was die Qualität der Korrelation deutlich verbessert. Auch hier ist aber das nur spärlich zur Verfügung stehende Gewebe hinderlich; zum einen aufgrund der glücklicherweise heutzutage nur selten durchzuführenden E nukleationen, zum anderen der dann aber meist doch zugrundeliegenden Augenveränderungen (welche die Indikation zur E nukleation rechtfertigen) mit massiv veränderten Bulbi, die keine ordentliche multimodale Bildgebung und Histologie erlauben würden. Da Tumore, insbesondere das Aderhautmelanom, die Hauptursache für E nukleationen darstellen, muss aus forensischen Gründen zusätzlich beachtet werden, dass die Gewebe histopathologisch untersucht und begutachtet werden. Dies geschieht aber oftmals mit Methoden, die einer nachträglichen Korrelation mit strukturellen Daten nicht immer zugänglich sind (insbesondere andere Schnittrichtungen, -techniken, Einbettmethoden).

Daher ist nach anderen Quellen zur Geweberekrutierung zu suchen. An einigen Universitätsaugenkliniken in Deutschland, wie auch der des Universitätsklinikums Würzburg, kommen dafür zum Beispiel auch eigene Gewebebanken bzw. Hornhautbanken in Betracht. Deren Hauptfunktion ist die Rekrutierung von Spenderhornhäuten von Verstorbenen, um diese aufzubereiten, zu klassifizieren und für die Transplantation vorzubereiten. Dabei wird dem Verstorbenen vor Ort meist zunächst der komplette Bulbus entnommen, auf Eis gelagert und in das Labor der Hornhautbank gebracht. Dort wird die Hornhaut mittels Trepanation abpräpariert und das Restgewebe normalerweise verworfen. Bei Zustimmung (vor dem Tod selbst bzw. durch die Angehörigen) kann das Restgewebe auch für wissenschaftliche Fragestellungen verwendet werden.

Aufgrund der großen Anzahl an Hornhautbanken und -spenden (jährlich ca. 6000 Hornhautspenden deutschlandweit) könnte dies als gute Möglichkeit zur Gewinnung von

post mortem Gewebe für wissenschaftliche Fragestellungen gesehen werden. Problematisch ist hierbei jedoch die oft fehlende Möglichkeit zur Korrelation mit *in vivo* Aufnahmen, die entweder schlicht nicht existieren oder nur sehr mühsam und Ressourcen-belastend (Abklärung der datenschutzrechtlichen Bestimmungen, Laden und Zuordnen der Bilddateien, etc.) zu besorgen sind. Eine *ex vivo* Bildgebung und histologische Aufarbeitung des Gewebes müsste dann schließlich auch der prä mortem durchgeführten *in vivo* Bildgebung entsprechen, um Korrelationen zu erlauben.

Die Zeit zwischen Versterben und Fixierung ist von Hornhautbank zu Hornhautbank unterschiedlich und kann in der Regel 18-48 Stunden betragen, maximal sogar bis 72 Stunden. Dabei spricht diesem Vorgehen auch prinzipiell nichts entgegen, da Hornhäute auch nach diesen langen Zeiten hervorragend zur Transplantation geeignet sind. Für wissenschaftliche Fragestellungen, insbesondere für Untersuchungen an der äußeren Netzhaut, sind diese langen Zeiten aber nicht tolerabel. Es kommt bereits in den ersten Stunden post mortem zu signifikanten biochemischen Umbauprozessen im Gewebe, welche die Qualität und Aussagefähigkeit deutlich einschränken. Zhu et al. zeigten, dass es bereits nach einer halben Stunde post mortem zu Veränderungen von 18 % der Metaboliten kommt, nach 8 Stunden sogar von 51 % (Zhu, Yam et al. 2018).

Erschwerend kommt hinzu, dass strukturelle Veränderungen mit zunehmender post mortem Zeit einsetzen und z.B. zu artifizieller Netzhautablösung führen. Diese schreitet post mortem fort und macht das Gewebe so auch für die *ex vivo* Bildgebung und die Histologie oft unbrauchbar. Auch präoperativ vorliegende Veränderungen im Sinne einer serösen Netzhautablösung, z.B. bei gleichzeitigem Vorliegen von Tumoren, erschwert auch eine prä mortem bzw. präoperativ qualitativ hochwertige Bildgebung erheblich (Singh and Singh 2012).

Aufgrund oben genannter Gründe ist es deshalb notwendig, die post mortem Zeit möglichst knapp zu halten.

Messinger et al. erreichten beispielsweise in ihren Untersuchungen an der University of Alabama at Birmingham und der Zusammenarbeit mit der Eye Sight Foundation,

Birmingham, AL, USA (aus denen auch die Proben für unsere CNTF-Untersuchungen gewonnen wurden) eine „Death-to-Preservation-Time“ von etwa 3,5 Stunden (Messinger, KImble et al. 2018), was unter den derzeitigen Gegebenheiten in Deutschland beinahe unerreichbar erscheint.

Insgesamt kann deshalb nur ein Bruchteil der derzeit vorhandenen Bulbi verwendet werden, die in der Klinik enukleiert werden bzw. als Gewebespenden vorhanden sind. Viele potenzielle Gewebespenden scheiden bereits in einer frühen Phase aus.

Bei Verkürzung von post mortem Zeiten wäre die Probenrekrutierung über Hornhautbanken sicher eine gute Möglichkeit, quantitative und qualitative Parameter für die experimentelle ophthalmologische Gewebegewinnung zu erhöhen bzw. zu verbessern.

4.3 Multimodale Bildgebung

Für die bestmögliche Korrelation von *in vivo* und *ex vivo* retinaler Bildgebung war es wichtig, möglichst wenige Parameter zwischen den Aufnahmen zu verändern. Dabei erschien es sinnvoll, für das identische Gewebe ebenso identische Geräte zur multimodalen Aufnahme zu verwenden. Dafür musste ein speziell angefertigter Augenhalter gebaut werden, der exakt so befestigt wird, dass die Position des Bulbus der Position des Spenderauges *in vivo* entspricht. Eine entsprechende „Kammer“, die mit Pufferlösung gefüllt ist und der eine 60-Dioptrien-Linse vorgeschaltet ist, wurde bereits von Messinger et al. beschrieben. Damit erfolgte die *ex vivo* cSLO Bildgebung. Jedoch wurden bei dem dort gezeigten Beispiel nicht baugleiche Geräte für die Bildgebung verwendet (Messinger, KImble et al. 2018). Die Verwendung identischer Geräte, wie in unserer Arbeit gezeigt, ermöglicht aber bei entsprechend guter Gewebequalität die Anfertigung von „Follow-up“ Untersuchungen. Diese werden in der klinischen Praxis bereits routinemäßig eingesetzt und ermöglichen so einen direkten Vergleich von Gewebeausschnitten über die Zeit hinweg. Diese Vorteile können elegant für die hier vorgestellten Versuche übernommen werden, in dem *in vivo* und *ex vivo* Aufnahmeserien Baseline und Follow-up Untersuchung darstellen - was bei exakt ausgerichteten Geweben (*ex vivo* mittels Gewebehalter) sehr gut gelingt.

Bereits 2015 zeigten Litts und Kollegen die Korrelation von *in vivo* und *ex vivo* retinalen Aufnahmen mit der Histologie am Beispiel von Outer Retinal Tubulations (ORT) (Litts, Messinger et al. 2015). Die Korrelation der *in vivo* mit den *ex vivo* B-Scans der SD-OCT erfolgte analog zur hier dargestellten Methode mithilfe des „Eye Trackings“ (Spectralis; Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany). Das Gewebe wurde dabei post mortem gewonnen. Die letzte *in vivo* Bildgebung bei augenärztlicher Vorstellung lag zum Zeitpunkt des Versterbens der Patientin bereits 8 Monate zurück. Dabei kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass in diesem Zeitraum natürliche Veränderungen im Gewebe stattgefunden haben, die eine spätere Korrelation nur bedingt erlauben. Im Gegensatz dazu konnte im hier gezeigten Ablauf die Zeit zwischen *in vivo* und *ex vivo* retinaler Bildgebung auf einen Tag verkürzt werden. Durch die verkürzten Abstände zwischen den Modalitäten ist eine weitaus exaktere Korrelation möglich.

Die Vorteile der *in vivo* – *ex vivo* histologischen Korrelationen haben sich eindrucksvoll in den letzten Jahren gezeigt. Mit Hilfe der OCT wurden unter anderem subretinal drusenoid deposits (SDD; auch retikuläre Pseudodrusen genannt) klassifiziert. Dabei handelt es sich um Ablagerungen von extrazellulärem Material zwischen Fotorezeptoren und RPE. Sie sind insbesondere in der temporal-superioren Perifovea zu finden. SDD und weiche Drusen sind beide als Risikofaktor für die Progression einer AMD anerkannt (Zarubina, Neely et al. 2016, Spaide, Yannuzzi et al. 2019) und ähneln sich in ihrer Protein-Zusammensetzung. Unterschiede gibt es aber beim Lipidgehalt und -zusammensetzung sowie ihrer Lokalisation am Augenhintergrund (Curcio, Messinger et al. 2013). Zudem zeigen Augen mit SDD eine langsame Dunkeladaptation und ein geringes Kontrastempfinden (Spaide, Ooto et al. 2018), alles Erkenntnisse, die durch die exakte räumliche Korrelation von *in vivo* und histologischen Befunden ermöglicht wurden.

Ein weiteres Beispiel für die Wichtigkeit exakter Korrelationen von OCT und Histologie sind ORT. Diese wurden zunächst von Zweifel et al. in der SD-OCT bei Patienten mit neovaskulärer AMD beschrieben (Zweifel, Engelbert et al. 2009). Hierbei handelt es sich, wie später histologisch validiert, um einfache bis weit verzweigte Strukturen/ Gangsysteme

im Bereich der äußeren Körnerschicht. Sie bestehen aus degenerierten Fotorezeptoren, die von externer limitierender Membran (Endfüßchen der Müller Zellen) umgeben sind und finden sich häufig in der Nähe von affektiertem RPE und/ oder Choroidea, also im Bereich von gliotischem Narbengewebe (Schaal, Freund et al. 2015). In der OCT erscheinen sie als hyporeflektive, ovale oder runde Strukturen mit einer umgebenden hyperreflektiven Membran. ORT müssen unbedingt von retinalen Zysten oder anderweitigen intraretinalen Flüssigkeitseinschlüssen unterschieden werden, um unnötigen Behandlungen vorzubeugen (Zweifel, Engelbert et al. 2009). Zysten haben zum einen keine hyperreflektive Membran, zum anderen finden sich ORT im Gegensatz zu Zysten in der Regel in der Nähe von verändertem RPE oder Narbengewebe (Schaal, Freund et al. 2015). Somit stellen ORT ein weiteres gutes Beispiel dar, bei dem die Korrelation von *in vivo* OCT und Histologie nicht nur zu neuen Beschreibungen pathologischer Veränderungen geführt und das Wissen zur Pathogenese erweitert hat, sondern auch Bedeutung für therapeutische Entscheidungen mitbringt.

Die beiden eben genannten Beispiele zeigen eindrucksvoll, dass auch heute noch mit der Histologie ein wichtiges Instrument zur besseren Darstellung und Interpretation von Pathologien, die in der *in vivo* Bildgebung entdeckt werden, zur Verfügung steht. Gleichzeitig liefert die *in vivo* Bildgebung nicht nur früher und bessere Erkenntnisse zur Progression von Erkrankungen, sondern sorgt durch die Beschreibung neu entdeckter Auffälligkeiten auch für ein weiteres Verständnis jener. Die Korrelation dieser multimodalen bildgebenden Methoden ist daher besonders wichtig und stellt ein großes Potenzial für das weitere Verständnis von ophthalmologischen Erkrankungen dar.

Jedoch ergeben sich zwei zentrale Probleme: durch eine zunehmende Zentralisierung und Auslagerung der Histopathologie-Expertise aus den Augenkliniken kommt die entsprechende Ausbildung in der Facharztweiterbildung kaum mehr vor (Rohrbach, Auw-Hädrich et al. 2009). Dadurch geht die wichtige Verknüpfung des klinischen Verständnisses von Erkrankungen mit der Grundlagenwissenschaft zum Erkennen von Veränderungen im Gewebe verloren. Zusätzlich wird auch heute noch in der medizinischen Ausbildung im

klinischen Studium von mikroskopischer und makroskopischer Pathologie gesprochen, was eine vermeintliche Trennung zusätzlich befeuert. Zweitens gestaltet sich die Gewebegewinnung in der Augenheilkunde äußerst schwierig (siehe Ausführungen oben). So besteht z.B. in Deutschland keine Infrastruktur, die es erlaubt, innerhalb annehmbarer post mortem-Zeit Bulbusspenden zu entnehmen. Diese Entnahmezeiten sind hierzulande, gerade im Vergleich zu den USA, sehr lange.

In der Grundlagenforschung werden häufig zunächst Erkenntnisse am Tiermodell gewonnen und auch neue Therapien werden oft primär am Tier erforscht. Dies ist gerade am Anfang neuer Entwicklungen wichtig, um die Wirksamkeit und Toxizität von neuen Arzneistoffen zu bestimmen. Im Bereich der Ophthalmologie ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen jedoch oft kritisch zu sehen. Das liegt beispielsweise daran, dass häufig verwendete Tiermodelle, wie z.B. Nager, keine Makula besitzen (Goodchild, Ghosh et al. 1996, Volland, Esteve-Rudd et al. 2015). Diese ist jedoch als Stelle des schärfsten Sehens von immenser Bedeutung für die retinale Forschung am Menschen, z.B. für die Erforschung der AMD, welche in westlichen Ländern die häufigste Erblindungsursache im höheren Lebensalter darstellt. Dennoch wird das Mausauge oft als Tiermodell zur Erforschung der AMD und assoziierter Proteine und Moleküle benutzt.

4.4 CNTF

Im Jahr 2005 beschrieben Beltran et al. die Expression des spezifischen CNTF-Rezeptors α (CNTFR α) an der menschlichen Retina und bei verschiedenen Tieren. Dabei fanden sie starke Unterschiede zwischen Nagern und Nicht-Nagern, was die kritische Bewertung der Übertragbarkeit von Informationen im Tiermodell betont (Beltran, Rohrer et al. 2005). Dennoch sind rasch Phase I und II Studien am Menschen bei verschiedenen Erkrankungen durchgeführt worden, um durch Therapie mit CNTF Umbauprozesse und das Fortschreiten von retinalen Atrophien zu verhindern bzw. zu verzögern.

Bei CNTF handelt es sich um eines der am besten erforschten neuropoetischen Zytokine. Es wurde 1979 am Hühnerauge entdeckt, bei dem es das Überleben der ziliären Ganglienzellen fördert (Adler, Landa et al. 1979). CNTF spielt eine wichtige Rolle für das Überleben, die Proliferation, die Differenzierung und die Funktion insbesondere von neuronalen Zellen. Es gehört zur Familie der IL-6-Zytokine. Der Rezeptor von CNTF besteht aus 3 Untereinheiten (gp130, LIFR β und CNTFR α), von denen CNTFR α spezifisch CNTF bindet (Wen, Tao et al. 2012). Es vermittelt seine Wirkung über den JAK/STAT-Signalweg (Peterson, Wang et al. 2000). CNTF scheint neben dem zentralen Nervensystem noch andere vielversprechende Wirkorte zu haben, wie z.B. Adipositas mit den assoziierten Folgeerkrankungen (Matthews and Febbraio 2008, Perugini, Di Mercurio et al. 2019). CNTF wurde im Fachgebiet der Ophthalmologie insbesondere für degenerative retinale Erkrankungen als mögliches Therapeutikum entdeckt. Dazu zählen neben der Retinitis Pigmentosa und der Makulären Teleangiektasien Typ 2 (Mac Tel 2) insbesondere die AMD (Zhang, Hopkins et al. 2011, Birch, Weleber et al. 2013, Chew, Clemons et al. 2015).

Obwohl CNTF viele nachgewiesene positive Eigenschaften, insbesondere auf neuronale Strukturen zu haben scheint, ist ein Fehlen von CNTF relativ häufig. Insgesamt 2,3 % der japanischen Bevölkerung besitzen eine entsprechende Nullmutation. Dabei besteht allerdings keine erhöhte Assoziation zu neurologischen Erkrankungen (Takahashi, Yokoji et al. 1994). CNTF wird für die klinische Anwendung in der Neurologie schon lange erforscht. Bereits 1996 gab es eine Phase-1-Studie zur Anwendung von CNTF über ECT bei Amyotropher Lateralsklerose (ALS). Dabei werden Zellen gentechnisch so verändert, dass sie CNTF produzieren. Diese werden, umgeben von einer semipermeablen Membran, in eine Körperhöhle (z.B. intrathekal) implantiert. Dadurch können systemische Nebenwirkungen reduziert werden (Aebischer, Schlupe et al. 1996). Weiterhin gibt es vielversprechende Studien zur Wirksamkeit von CNTF bei Chorea Huntington am Affenmodell. Emerich et al. verabreichten CNTF ebenfalls über ECT, hier jedoch direkt in das Corpus striatum (Emerich, Winn et al. 1997). In klinischen Phase-1-Studien konnte die Sicherheit dieser Technologie bestätigt werden, jedoch waren nur geringe klinische Effekte zu beobachten (A.-C. Bachoud-Lévi, N. Déglon et al. 2000, Dr. J. Bloch, A.C. Bachoud-Lévi et al. 2004).

Miller et al. beschrieben 1996 die Nebenwirkungen von rekombinanten humanen CNTF bei Patienten mit ALS. Besonders auffällig war dabei der beschriebene dosisabhängige Gewichtsverlust (Miller, Bryan et al. 1996). Daher wurde es neben der Neurologie auch für die Adipositas-Forschung entdeckt. Am Mausmodell konnte ein Schutz vor Diabetes mellitus Typ 2 durch CNTF nachgewiesen werden. Diese erhöhe die Anzahl an β -Zellen und senke gleichzeitig die Kreatinin-Clearance (Rezende, Santos et al. 2012). In klinischen Phase-2-Studien zur Adipositas-therapie durch CNTF konnte ein Gewichtsverlust ebenfalls beobachtet werden. Jedoch kam es zu Nebenwirkungen, wie Schwindel, Husten und muskuloskelettalen Beschwerden. Einige Patienten bildeten außerdem neutralisierende Antikörper (Ettinger, Littlejohn et al. 2003).

Neben all diesen Effekten wird CNTF seit einigen Jahren auch am Auge erforscht. Bucher et al. beschrieben zum Beispiel den anti-angiogenetischen Effekt von intraokulärem CNTF an einem Mausmodell von O₂-induzierter Retinopathie (Bucher, Walz et al. 2016). Außerdem wurde die Retinitis Pigmentosa, eine degenerative Erkrankung der Fotorezeptoren, als möglicherweise mit CNTF therapierbar erkannt. Dies konnte zunächst 2002 am Tiermodell (rcd1-Hund mit PDE6B-Mangel) gezeigt werden (Tao, Wen et al. 2002). In klinischen Phase-1-Studien konnte die Sicherheit einer CNTF-Gabe über ECT bestätigt werden. Außerdem scheint CNTF einen positiven Effekt auf den Visus zu haben (Sieving, Caruso et al. 2006). In einer späteren Studie konnte jedoch kein therapeutischer Benefit nachgewiesen werden (Birch, Weleber et al. 2013). Ein weiterer klinischer Ansatzpunkt ist die Mac Tel 2 (Chew, Clemons et al. 2015).

Neben der Retinitis Pigmentosa und Mac Tel 2 ist aber insbesondere ein CNTF-Therapieansatz bei AMD interessant. Bei dieser häufigen, fortschreitenden Erkrankung gibt es auch heute noch kaum Therapiemöglichkeiten, v. a. in Bezug auf die trockene AMD und ihre Spätform, die Geographische Atrophie. In einer Pilot-Phase 2-Studie von Zhang et al. beschrieben diese eine dosisabhängige Zunahme der retinalen Dicke und eine Stabilisierung des Visus unter ECT-verabreichtem CNTF (Zhang, Hopkins et al. 2011). Außerdem scheint die lokale ECT sicher zu sein und eine Bildung von neutralisierenden Antikörpern vorzubeugen (Kauper, McGovern et al. 2012). Da bisher kein grundlagenwissenschaftliches Verständnis zur natürlichen Expression von CNTF am gesunden und pathologischen

humanen Auge bestand, war ein Ziel dieser Doktorarbeit, an menschlichen retinalen Proben (zeitnah post mortem gewonnen durch den vorbeschriebenen Ansatz) die CNTF Expression immunhistochemisch nachzuweisen.

Bisherige Studien konzentrierten sich hauptsächlich auf den spezifischen Rezeptor CNTFR α und die klinischen Wirkorte von CNTF. Dieser Rezeptor wurde in der Nervenfaserschicht, der Ganglienzellschicht, der inneren plexiformen, der inneren nukleären und der äußeren plexiformen Schicht bei verschiedenen Tiermodellen (Ratte, Hunde, Katze, Schwein) und Menschen nachgewiesen. Eine Expression von CNTFR α in den Fotorezeptoren konnte bislang nur bei Nicht-Nagern gezeigt werden (Beltran, Rohrer et al. 2005). Hier zeigt sich ein massiver Unterschied zum gerne verwendeten Nager-Tiermodell.

Die klinischen Wirkorte von CNTF werden derzeit noch diskutiert. Zu diesen zählen laut Bucher et al. insbesondere die Endothelzellen retinaler Gefäße. CNTF aktiviere in diesen den JAK/STAT3/SOCS3-Signalweg und sorge für weniger Neovaskularisationen bei hypoxischer Netzhaut. Dieser anti-angiogenetische Effekt konnte auch in vitro bestätigt werden (Bucher, Walz et al. 2016).

Trotz dieser vielfachen Beschreibung in der Literatur ist kritisch anzumerken, dass in den erwähnten Arbeiten der immunhistochemische Nachweis von CNTF entweder gar nicht erfolgte oder auf den veröffentlichten Abbildungen kaum sichtbar ist. Auch bei unseren Versuchen kam es zu deutlichen Schwierigkeiten bei der immunhistochemischen Darstellung von CNTF in unseren Spenderproben.

Nach Anpassung mehrerer Parameter (insbesondere der Pufferlösung, des pH-Wertes und der Antikörper-Konzentrationen) konnte schlussendlich ein Protokoll etabliert werden, bei dem weder von einer ubiquitären Anfärbung, noch von einer Minderrepräsentation ausgegangen werden kann. Nach Standardisierung wurden gesunde mit pathologischen AMD Augen verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass bereits bei den Frühformen der AMD eine gesteigerte Expression in den Fotorezeptoren im Vergleich zu unauffälligen Augen bestand (bei denen außer im Endothel retinaler Gefäße keine spezifische Anfärbung nachweisbar war). Bei Vorliegen von neovaskulärer AMD wurde die CNTF-Expression in den Fotorezeptor-Außensegmenten scheinbar hochreguliert. Außerdem besteht eine

schwache Expression von CNTF bei Augen mit GA im Zytoplasma der äußeren Körnerzellschicht. Weitere Studien müssen diese Ergebnisse molekularbiologisch bestätigen. Da klinisch ein positiver Effekt der intravitrealen CNTF-Gabe beschrieben wird, erscheinen diese Ergebnisse plausibel. Bucher et al. beschrieben die physiologische Hochregulation von CNTF bei induzierter retinaler Hypoxie am Mausauge. Gleichzeitig führe die intravitreale Gabe von CNTF zu weniger Neovaskularisationen (Bucher, Walz et al. 2016, Bucher, Aguilar et al. 2020). In diesen Kontext fügen sich auch unsere Ergebnisse, die immunhistochemisch insbesondere bei der neovaskulären AMD (einem Sauerstoffmangelzustand der Makula) eine starke Expression von CNTF zeigen. Eine Anfärbung im Bereich der Endothelzellen deckt sich ebenfalls mit der von Bucher et al. aufgestellten These, dass der Wirkungsort von CNTF im Bereich der Endothelzellen zu finden sei (Bucher, Walz et al. 2016). Über den JAK/STAT/SOCS3-Signalweg würde eine Abnahme von Neovaskularisationen bewirkt. Es ist vorstellbar, dass bei geschädigten Fotorezeptoren eine physiologische Hochregulation der CNTF-Expression erfolgt, um diese vor weiteren Schäden zu schützen. Dies muss in folgenden Arbeiten überprüft werden.

4.5 Limitationen

Der erfolgreiche Aufbau und die Durchführung der Methode konnte an einem Auge beispielhaft gezeigt werden. Wünschenswert wäre gewesen, mehr Augen gewinnen zu können. Hinderlich waren hierbei, neben den bereits erwähnten Schwierigkeiten der Probengewinnung, auch die teilweise schlecht im Vorfeld *in vivo* durchführbare Bildgebung. Insbesondere bei Patienten mit z.B. Narben im Bereich der Hornhaut, Linsentrübungen oder andere Beeinträchtigungen der optischen Achse, die zu keinen verwertbaren Aufnahmen in der *in vivo* Diagnostik geführt hat. Die immunhistochemischen Versuche gestalteten sich sehr zeitintensiv mit der Optimierung eines Färbeprotokolls. Im Vergleich mit der vorhandenen Literatur fällt auf, dass ein entsprechender CNTF-Nachweis vermutlich auch anderen Arbeitsgruppen schwerfällt, und die Expressionsorte von CNTF in der menschlichen Netzhaut weiter kritisch untersucht werden müssen.

5. Zusammenfassung

An der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Würzburg wurde ein standardisiertes System zur vergleichenden *in vivo/ ex vivo* und histologischen retinalen Bildgebung des menschlichen Auges etabliert. In der vorliegenden „proof of concept study“ konnte der Arbeitsablauf anhand eines Auges, welches zur Enukleation vorgesehen war, erfolgreich gezeigt werden. Dieses System kann als Ausgangspunkt für weitere wissenschaftliche Fragestellungen gesehen werden. Dafür wird eine größere Anzahl an Gewebespendern benötigt. Das Gewebe wird bisher zum einen kommerziell post mortem und zum anderen von Gewebespendern nach Enukleation oder post mortem erworben. Die multimodale Bildgebung besteht aus der Farbfundusfotografie, sowie der cSLO (Confocal Scanning Laser Ophthalmoscopy) und der HRA 2 (Heidelberg Retina Angiograph 2). Die *ex vivo* multimodale retinale Bildgebung erfolgt analog dazu, jedoch wird statt einer Funduskamera ein speziell installiertes Dissektionsmikroskop verwendet. Für die cSLO wurde ein eigens konzipierter Augenhalter hergestellt, der die Aufnahme am identischen Gerät, wie es auch für die *in vivo* Bildgebung verwendet wird, erlaubt. Die histologische Aufarbeitung des Gewebes erfolgt im Anschluss und ermöglicht die Korrelation von technisch gefundenen Veränderungen mit lichtmikroskopisch beschriebenen Auffälligkeiten. Diese histologischen Korrelate tragen zum besseren Verständnis von *in vivo* gefundenen Veränderungen bei. Gleichzeitig verbessern neu gefundene Auffälligkeiten in der *in vivo* Bildgebung das Verständnis vieler retinaler Erkrankungen. Die Vorteile exzellent konservierter, aufbereiteter und histologisch untersuchter Proben wurde hier am Beispiel der CNTF-Expression dargestellt. Dieses Zytokin konnte bei der AMD insbesondere in den Fotorezeptoraußensegmenten nachgewiesen werden, was in folgenden Studien molekularbiologisch bestätigt werden muss. Außerdem müssen weitere Mediatoren des CNTF-Signalwegs, wie z.B. pSTAT3, untersucht werden.

Dieses System der vergleichenden *in vivo, ex vivo* und histologischen Korrelation bietet vielfältige Möglichkeiten - zur weiteren Forschung und damit zum besseren Verständnis zahlreicher retinaler Erkrankungen.

6. Literaturverzeichnis

A.-C. Bachoud-Lévi, N. Déglon, J.-P. Nguyen, J. Bloch, C. Bourdet, L. Winkel, P. Rémy, M. Goddard, J.-P. Lefaucheur, P. Brugières, S. Baudic, P. Cesaro, M. Peschanski and P. Aebischer (2000). "Neuroprotective Gene Therapy for Huntington's Disease Using a Polymer Encapsulated BHK Cell Line Engineered to Secrete Human CNTF." Human Gene Therapy **11**(12): 1723-1729.

Adler, R., K. B. Landa, M. Manthorpe and S. Varon (1979). "Cholinergic neuronotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons." Science **204**(4400): 1434-1436.

Advancing-Sight-Network. (2021). Retrieved 28.07.2021, 2021, from <https://advancingsight.org>.

Aebischer, P., M. Schlupe, N. Déglon, J.-M. Joseph, L. Hirt, B. Heyd, M. Goddard, J. P. Hammang, A. D. Zurn, A. C. Kato, F. Regli and E. E. Baetge (1996). "Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients." Nature Medicine **2**(6): 696-699.

Alkeus Pharmaceuticals, I. (2019). "Phase 3 Study of ALK-001 in Geographic Atrophy (SAGA)." Retrieved 28.07.2021, 2021, from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03845582>.

Anger, E. M., A. Unterhuber, B. Hermann, H. Sattmann, C. Schubert, J. E. Morgan, A. Cowey, P. K. Ahnelt and W. Drexler (2004). "Ultra-high resolution optical coherence tomography of the monkey fovea. Identification of retinal sublayers by correlation with semithin histology sections." Experimental Eye Research **78**(6): 1117-1125.

Aumann, S., S. Donner, J. Fischer and F. Müller (2019). "Optical coherence tomography (OCT): Principle and technical realization." High Resolution Imaging in Microscopy and Ophthalmology: 59-85.

Bagheri, N., B. A. Bell, V. L. Bonilha and J. G. Hollyfield (2012). Imaging human postmortem eyes with SLO and OCT. Retinal Degenerative Diseases, Springer: 479-488.

Balaratnasingam, C., J. D. Messinger, K. R. Sloan, L. A. Yannuzzi, K. B. Freund and C. A. Curcio (2017). "Histologic and Optical Coherence Tomographic Correlates in Drusenoid Pigment Epithelium Detachment in Age-Related Macular Degeneration." Ophthalmology **124**(5): 644-656.

Bechara, F. G., T. Gambichler, M. Stücker, A. Orlikov, S. Rotterdam, P. Altmeyer and K. Hoffmann (2004). "Histomorphologic correlation with routine histology and optical coherence tomography." Skin Research and Technology **10**(3): 169-173.

Beltran, W. A., H. Rohrer and G. D. Aguirre (2005). "Immunolocalization of ciliary neurotrophic factor receptor alpha (CNTFRalpha) in mammalian photoreceptor cells." Mol Vis **11**: 232-244.

Birch, D. G., R. G. Weleber, J. L. Duncan, G. J. Jaffe and W. Tao (2013). "Randomized Trial of Ciliary Neurotrophic Factor Delivered by Encapsulated Cell Intraocular Implants for Retinitis Pigmentosa." American Journal of Ophthalmology **156**(2): 283-292.e281.

Bloch, A.C. Bachoud-Lévi, N. Déglon, J.P. Lefaucheur, L. Winkel, S. Palfi, J.P. Nguyen, C. Bourdet, P. Remy, P. Brugières, M. F. Boisse, S. Baudic, P. Cesaro, P. Hantraye, P. Aebischer and M. Peschanski (2004). "Neuroprotective Gene Therapy for Huntington's Disease, Using Polymer-Encapsulated Cells Engineered to Secrete Human Ciliary Neurotrophic Factor: Results of a Phase I Study." Human Gene Therapy **15**(10): 968-975.

Boulton, T. G., N. Stahl and G. D. Yancopoulos (1994). "Ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/interleukin 6/oncostatin M family of cytokines induces tyrosine phosphorylation of a common set of proteins overlapping those induced by other cytokines and growth factors." J Biol Chem **269**(15): 11648-11655.

Bressler, N. M., S. B. Bressler and S. L. Fine (1988). "Age-related macular degeneration." Survey of Ophthalmology **32**(6): 375-413.

Brown, N. H., A. F. Koreishi, M. McCall, J. A. Izatt, C. B. Rickman and C. A. Toth (2009). "Developing SDOCT to assess donor human eyes prior to tissue sectioning for research." Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology **247**(8): 1069-1080.

Bucher, F., E. Aguilar, K. V. Marra, J. Rapp, J. Arnold, S. Diaz-Aguilar, C. Lange, H. Agostini, G. Schlunck, A. Stahl and M. Friedlander (2020). "CNTF Prevents Development of Outer Retinal Neovascularization Through Upregulation of CxCl10." Investigative Ophthalmology & Visual Science **61**(10): 20-20.

Bucher, F., J. M. Walz, A. Bühler, E. Aguilar, C. Lange, S. Diaz-Aguilar, G. Martin, G. Schlunck, H. Agostini, M. Friedlander and A. Stahl (2016). "CNTF Attenuates Vasoproliferative Changes Through Upregulation of SOCS3 in a Mouse-Model of Oxygen-Induced Retinopathy." Invest Ophthalmol Vis Sci **57**(10): 4017-4026.

Chen, L., J. D. Messinger, K. R. Sloan, T. A. Swain, Y. Sugiura, L. A. Yannuzzi, C. A. Curcio and K. B. Freund (2020). "Nonexudative macular neovascularization supporting outer retina in age-related macular degeneration: a clinicopathologic correlation." Ophthalmology **127**(7): 931-947.

Chen, L., J. D. Messinger, Y. Zhang, R. F. Spaide, K. B. Freund and C. A. Curcio (2020). "Subretinal drusenoid deposit in age-related macular degeneration: histologic insights into initiation, progression to atrophy, and imaging." Retina **40**(4): 618-631.

Chen, T. C., B. Cense, J. W. Miller, P. A. Rubin, D. G. Deschler, E. S. Gragoudas and J. F. de Boer (2006). "Histologic correlation of in vivo optical coherence tomography images of the human retina." American journal of ophthalmology **141**(6): 1165-1168.

Chen, T. C., B. Cense, J. W. Miller, P. A. D. Rubin, D. G. Deschler, E. S. Gragoudas and J. F. de Boer (2006). "Histologic Correlation of In Vivo Optical Coherence Tomography Images of the Human Retina." American Journal of Ophthalmology **141**(6): 1165-1168.

Chew, E. Y., T. E. Clemons, T. Peto, F. B. Sallo, A. Ingerman, W. Tao, L. Singerman, S. D. Schwartz, N. S. Peachey and A. C. Bird (2015). "Ciliary neurotrophic factor for macular telangiectasia type 2: results from a phase 1 safety trial." American journal of ophthalmology **159**(4): 659-666. e651.

Chew, E. Y., T. E. Clemons, T. Peto, F. B. Sallo, A. Ingerman, W. Tao, L. Singerman, S. D. Schwartz, N. S. Peachey and A. C. Bird (2015). "Ciliary Neurotrophic Factor for Macular Telangiectasia Type 2: Results From a Phase 1 Safety Trial." American Journal of Ophthalmology **159**(4): 659-666.e651.

Chong, N. H., R. A. Alexander, L. Waters, K. C. Barnett, A. C. Bird and P. J. Luthert (1999). "Repeated injections of a ciliary neurotrophic factor analogue leading to long-term photoreceptor survival in hereditary retinal degeneration." Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(6): 1298-1305.

Copland, D. A., S. Theodoropoulou, J. Liu and A. D. Dick (2018). "A perspective of AMD through the eyes of immunology." Investigative ophthalmology & visual science **59**(4): AMD83-AMD92.

Curcio, C. A. (2006). "Declining availability of human eye tissues for research." Investigative ophthalmology & visual science **47**(7): 2747-2749.

Curcio, C. A. (2018). "A new online portal will match eye banks with researchers seeking human ocular tissues." Investigative ophthalmology & visual science **59**(12): 4796-4797.

Curcio, C. A., N. E. Medeiros and C. L. Millican (1998). "The Alabama age-related macular degeneration grading system for donor eyes." Investigative ophthalmology & visual science **39**(7): 1085-1096.

Curcio, C. A., J. D. Messinger, K. R. Sloan, G. McGwin, N. E. Medeiros and R. F. Spaide (2013). "Subretinal drusenoid deposits in non-neovascular age-related macular degeneration: morphology, prevalence, topography, and biogenesis model." Retina (Philadelphia, Pa.) **33**(2): 265-276.

Damico, F. M., F. Gasparin, M. R. Scolari, L. S. Pedral and B. S. Takahashi (2012). "New approaches and potential treatments for dry age-related macular degeneration." Arq Bras Oftalmol **75**(1): 71-76.

Dawson, D. G., G. P. Holley, D. H. Geroski, G. O. Waring, H. E. Grossniklaus and H. F. Edelhauser (2005). "Ex Vivo Confocal Microscopy of Human LASIK Corneas with Histologic and Ultrastructural Correlation." Ophthalmology **112**(4): 634-644.

Donders, F. C. (1855). "Beiträge zur pathologischen Anatomie des Auges." Archiv für Ophthalmologie **1**(2): 106-118.

Emerich, D. F., S. R. Winn, P. M. Hantraye, M. Peschanski, E.-Y. Chen, Y. Chu, P. McDermott, E. E. Baetge and J. H. Kordower (1997). "Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease." Nature **386**(6623): 395-399.

Ettinger, M. P., T. W. Littlejohn, S. L. Schwartz, S. R. Weiss, H. H. McIlwain, S. B. Heymsfield, G. A. Bray, W. G. Roberts, E. R. Heyman, N. Stambler, S. Heshka, C. Vicary and H.-P. Guler (2003). "Recombinant Variant of Ciliary Neurotrophic Factor for Weight Loss in Obese Adults A Randomized, Dose-Ranging Study." JAMA **289**(14): 1826-1832.

Fercher, A. F., C. K. Hitzenberger, G. Kamp and S. Y. El-Zaiat (1995). "Measurement of intraocular distances by backscattering spectral interferometry." Optics communications **117**(1-2): 43-48.

Ferguson, L. R., S. Grover, J. M. Dominguez II, S. Balaiya and K. V. Chalam (2014). "Retinal thickness measurement obtained with spectral domain optical coherence tomography assisted optical biopsy accurately correlates with ex vivo histology." PloS one **9**(10): e111203.

Ferrington, D. A., D. Sinha and K. Kaarniranta (2016). "Defects in retinal pigment epithelial cell proteolysis and the pathology associated with age-related macular degeneration." Prog Retin Eye Res **51**: 69-89.

Ferris III, F. L., C. Wilkinson, A. Bird, U. Chakravarthy, E. Chew, K. Csaky, S. R. Sadda and B. I. f. M. R. C. Committee (2013). "Clinical classification of age-related macular degeneration." Ophthalmology **120**(4): 844-851.

Flaxman, S. R., R. R. Bourne, S. Resnikoff, P. Ackland, T. Braithwaite, M. V. Cicinelli, A. Das, J. B. Jonas, J. Keeffe and J. H. Kempen (2017). "Global causes of blindness and distance vision impairment 1990–2020: a systematic review and meta-analysis." The Lancet Global Health **5**(12): e1221-e1234.

Forte, R., G. Querques, L. Querques, N. Massamba, V. Le Tien and E. H. Souied (2012). "Multimodal imaging of dry age-related macular degeneration." Acta ophthalmologica **90**(4): e281-e287.

Garrity, S. T., D. Sarraf, K. B. Freund and S. R. Sadda (2018). "Multimodal imaging of nonneovascular age-related macular degeneration." Investigative ophthalmology & visual science **59**(4): AMD48-AMD64.

Ghazi, N. G., C. Dibernardo, H. Ying, K. Mori and P. Gehlbach (2005). "Optical Coherence Tomography of Enucleated Human Eye Specimens With Histological Correlation: Evaluation of the Origin of the Outer "Red Line" and Peripheral Retinal Pathology." Investigative Ophthalmology & Visual Science **46**(13): 3469-3469.

Ghazi, N. G., C. Dibernardo, H. S. Ying, K. Mori and P. L. Gehlbach (2006). "Optical Coherence Tomography of Enucleated Human Eye Specimens With Histological Correlation: Origin of the Outer "Red Line"." American Journal of Ophthalmology **141**(4): 719-719.e719.

Ghazi, N. G. and R. M. Knape (2006). "Optical Coherence Tomography of Peripheral Retinal Lesions in Enucleated Human Eye Specimens with Histologic Correlation II." Current Eye Research **31**(12): 1047-1049.

Gloesmann, M., B. Hermann, C. Schubert, H. Sattmann, P. K. Ahnelt and W. Drexler (2003). "Histologic correlation of pig retina radial stratification with ultrahigh-resolution optical coherence tomography." Investigative ophthalmology & visual science **44**(4): 1696-1703.

Goodchild, A. K., K. K. Ghosh and P. R. Martin (1996). "Comparison of photoreceptor spatial density and ganglion cell morphology in the retina of human, macaque monkey, cat, and the marmoset *Callithrix jacchus*." J Comp Neurol **366**(1): 55-75.

Greenberg, J. P., T. Duncker, R. L. Woods, R. T. Smith, J. R. Sparrow and F. C. Delori (2013). "Quantitative fundus autofluorescence in healthy eyes." Investigative ophthalmology & visual science **54**(8): 5684-5693.

Group“, T. A.-R. E. D. S. R. (1999). "The Age-Related Eye Disease Study (AREDS): design implications. AREDS report no. 1." Control Clin Trials **20**(6): 573-600.

Hartmann, D., S. Krammer, C. Ruini, T. Ruzicka and T. von Braunmühl (2016). "Correlation of histological and ex-vivo confocal tumor thickness in malignant melanoma." Lasers in Medical Science **31**(5): 921-927.

Hernández-Zimbrón, L. F., R. Zamora-Alvarado, L. Ochoa-De la Paz, R. Velez-Montoya, E. Zenteno, R. Gullias-Cañizo, H. Quiroz-Mercado and R. Gonzalez-Salinas (2018). "Age-Related Macular Degeneration: New Paradigms for Treatment and Management of AMD." Oxid Med Cell Longev **2018**: 8374647.

Huang, D., E. A. Swanson, C. P. Lin, J. S. Schuman, W. G. Stinson, W. Chang, M. R. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C. A. Puliafito and et al. (1991). "Optical coherence tomography." Science **254**(5035): 1178-1181.

Junius, P., Kuhnt, H. (1926). "Die scheibenförmige Entartung der Netzhaut, Degeneratio maculae luteae disciformis."

Kaiser, P. R. (2019). "Retina Pipeline: A View Into Ongoing Innovation [Interactive Pipeline]." Retrieved 28.07.2021, 2021, from <https://retinatoday.com/resource/therapeutic-pipeline-for-amd>.

Kauper, K., C. McGovern, S. Sherman, P. Heatherton, R. Rapoza, P. Stabila, B. Dean, A. Lee, S. Borges and B. Bouchard (2012). "Two-year intraocular delivery of ciliary neurotrophic factor by encapsulated cell technology implants in patients with chronic retinal degenerative diseases." Investigative ophthalmology & visual science **53**(12): 7484-7491.

Kauppinen, A. (2020). "Introduction to the multi-author review on macular degeneration." Cell Mol Life Sci **77**(5): 779-780.

- Kauppinen, A., J. J. Paterno, J. Blasiak, A. Salminen and K. Kaarniranta (2016). "Inflammation and its role in age-related macular degeneration." Cellular and Molecular Life Sciences **73**(9): 1765-1786.
- Kleefeldt, N., K. Bermond, I.-S. Tarau, J. Hillenkamp, A. Berlin, K. R. Sloan and T. Ach (2020). "Quantitative Fundus Autofluorescence: Advanced Analysis Tools." Translational Vision Science & Technology **9**(8): 2-2.
- Koinzer, S., M. Saeger, C. Hesse, L. Portz, S. Kleemann, K. Schlott, R. Brinkmann and J. Roeder (2013). "Correlation with OCT and histology of photocoagulation lesions in patients and rabbits." Acta Ophthalmologica **91**(8): e603-e611.
- Larheim, T. A., P.-L. Westesson, D. G. Hicks, L. Eriksson and D. A. Brown (1999). "Osteonecrosis of the temporomandibular joint: Correlation of magnetic resonance imaging and histology." Journal of Oral and Maxillofacial Surgery **57**(8): 888-898.
- LaVail, M. M., K. Unoki, D. Yasumura, M. T. Matthes, G. D. Yancopoulos and R. H. Steinberg (1992). "Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(23): 11249-11253.
- Lefevre, E., A. K. Toft-Kehler, R. Vohra, M. Kolko, L. Moons and I. Van Hove (2017). "Mitochondrial dysfunction underlying outer retinal diseases." Mitochondrion **36**: 66-76.
- Leung, B. O. and K. C. Chou (2011). "Review of super-resolution fluorescence microscopy for biology." Applied spectroscopy **65**(9): 967-980.
- Li, M., R. Dolz-Marco, C. Huisinigh, J. D. Messinger, R. M. Feist, D. Ferrara, K. B. Freund and C. A. Curcio (2019). "CLINICOPATHOLOGIC CORRELATION OF GEOGRAPHIC ATROPHY SECONDARY TO AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION." Retina **39**(4): 802-816.
- Li, M., R. Dolz-Marco, J. D. Messinger, L. Wang, R. M. Feist, C. A. Girkin, S. Gattoussi, D. Ferrara, C. A. Curcio and K. B. Freund (2018). "Clinicopathologic Correlation of Anti-Vascular Endothelial Growth Factor-Treated Type 3 Neovascularization in Age-Related Macular Degeneration." Ophthalmology **125**(2): 276-287.
- Liang, F. Q., T. S. Aleman, N. S. Dejneka, L. Dudus, K. J. Fisher, A. M. Maguire, S. G. Jacobson and J. Bennett (2001). "Long-term protection of retinal structure but not function using RAAV.CNTF in animal models of retinitis pigmentosa." Mol Ther **4**(5): 461-472.
- Litts, K. M., J. D. Messinger, K. Dellatorre, L. A. Yannuzzi, K. B. Freund and C. A. Curcio (2015). "Clinicopathological Correlation of Outer Retinal Tubulation in Age-Related Macular Degeneration." JAMA Ophthalmology **133**(5): 609-612.
- London, J., E. E. Kim, S. Wallace, A. Shirkhoda, J. Coan and H. Evans (1989). "MR Imaging of Liposarcomas: Correlation of MR Features and Histology." Journal of Computer Assisted Tomography **13**(5): 832-835.

- Matthews, V. B. and M. A. Febbraio (2008). "CNTF: a target therapeutic for obesity-related metabolic disease?" Journal of Molecular Medicine **86**(4): 353-361.
- Messinger, J. D., J. Klumbe, A. Blake, K. B. Freund, T. Smith, T. Ach and C. A. Curcio (2018). "Optimized human ocular tissue recovery and ex vivo multimodal imaging (MMI) for research in age-related macular degeneration (AMD)." Investigative Ophthalmology & Visual Science **59**(9): 3237-3237.
- Miller, R. G., W. W. Bryan, M. A. Dietz, T. L. Munsat, J. H. Petajan, S. A. Smith and J. C. Goodpasture (1996). "Toxicity and tolerability of recombinant human ciliary neurotrophic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis." Neurology **47**(5): 1329-1331.
- Moreira-Neto, C. A., S. Bergeron, J. Coblentz, P. Zoroquiain, S. Maloney, C. Mastromonaco, E. Esposito, A. Romano, R. B. Neto and C. A. Moreira Jr (2019). "Optimizing optical coherence tomography and histopathology correlation in retinal imaging." Canadian Journal of Ophthalmology **54**(2): 280-287.
- Morsy, H., S. Kamp, L. Thrane, N. Behrendt, B. Saunderson, H. Zayan, E. A. Elmagid and G. B. E. Jemec (2010). "Optical coherence tomography imaging of psoriasis vulgaris: correlation with histology and disease severity." Archives of Dermatological Research **302**(2): 105-111.
- Perugini, J., E. Di Mercurio, G. Tossetta, I. Severi, F. Monaco, M. Reguzzoni, M. Tomasetti, C. Dani, S. Cinti and A. Giordano (2019). "Biological Effects of Ciliary Neurotrophic Factor on hMADS Adipocytes." Front Endocrinol (Lausanne) **10**: 768.
- Peterson, W. M., Q. Wang, R. Tzekova and S. J. Wiegand (2000). "Ciliary neurotrophic factor and stress stimuli activate the Jak-STAT pathway in retinal neurons and glia." J Neurosci **20**(11): 4081-4090.
- Puhakka, K. B., F. Melsen, A. G. Jurik, L. W. Boel, A. Vesterby and N. Egund (2004). "MR imaging of the normal sacroiliac joint with correlation to histology." Skeletal Radiology **33**(1): 15-28.
- Regatieri, C. V., L. Branchini and J. S. Duker (2011). "The role of spectral-domain OCT in the diagnosis and management of neovascular age-related macular degeneration." Ophthalmic Surg Lasers Imaging **42 Suppl**(0): S56-66.
- Rezende, L. F., G. J. Santos, J. C. Santos-Silva, E. M. Carneiro and A. C. Boschero (2012). "Ciliary neurotrophic factor (CNTF) protects non-obese Swiss mice against type 2 diabetes by increasing beta cell mass and reducing insulin clearance." Diabetologia **55**(5): 1495-1504.
- Rohrbach, J., C. Auw-Hädrich, E. Messmer, D. Süsskind and K. Löffler (2009). "Zur Situation der Ophthalmopathologie in Deutschland: eine aktuelle Bestandsaufnahme." Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde **226**(09): 740-746.
- Rose-John, S. (2018). "Interleukin-6 family cytokines." Cold Spring Harbor perspectives in biology **10**(2): a028415.

- Sacconi, R., M. Casaluci, E. Borrelli, G. Mulinacci, F. Lamanna, F. Gelormini, A. Carnevali, L. Querques, G. Zerbini and F. Bandello (2019). "Multimodal imaging assessment of vascular and neurodegenerative retinal alterations in type 1 diabetic patients without fundoscopic signs of diabetic retinopathy." Journal of clinical medicine **8**(9): 1409.
- Sakata, L. M., J. DeLeon-Ortega, V. Sakata and C. A. Girkin (2009). "Optical coherence tomography of the retina and optic nerve—a review." Clinical & experimental ophthalmology **37**(1): 90-99.
- Salminen, A., J. Ojala, K. Kaarniranta and A. Kauppinen (2012). "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress activate inflammasomes: impact on the aging process and age-related diseases." Cell Mol Life Sci **69**(18): 2999-3013.
- Schaal, K. B., K. B. Freund, K. M. Litts, Y. Zhang, J. D. Messinger and C. A. Curcio (2015). "OUTER RETINAL TUBULATION IN ADVANCED AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION: Optical Coherence Tomographic Findings Correspond to Histology." Retina **35**(7): 1339-1350.
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak and A. Cardona (2012). "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis." Nat Methods **9**(7): 676-682.
- Schlanitz, F. G., B. Baumann, M. Kundi, S. Sacu, M. Baratsits, U. Scheschy, A. Shahlaee, T. J. Mittermüller, A. Montuoro and P. Roberts (2017). "Drusen volume development over time and its relevance to the course of age-related macular degeneration." British Journal of Ophthalmology **101**(2): 198-203.
- Schuman, S. G., A. F. Koreishi, S. Farsiu, S.-h. Jung, J. A. Izatt and C. A. Toth (2009). "Photoreceptor layer thinning over drusen in eyes with age-related macular degeneration imaged in vivo with spectral-domain optical coherence tomography." Ophthalmology **116**(3): 488-496. e482.
- Seddon, I. B. (2021). "Treatment Pipeline for Dry Age-Related Macular Degeneration." Ophthalmology Management.
- Seitz, B., K. Bluthner, F. Kruse, T. Reinhard and R. Sundmacher (2004). "Zu geringe Spendenbereitschaft." DEUTSCHES ARZTEBLATT-KOLN- **101**(49): 2666.
- Sieving, P. A., R. C. Caruso, W. Tao, H. R. Coleman, D. J. Thompson, K. R. Fullmer and R. A. Bush (2006). "Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(10): 3896-3901.
- Singh, P. and A. Singh (2012). "Choroidal melanoma." Oman J Ophthalmol **5**(1): 3-9.
- Spaide, R. F., S. Ooto and C. A. Curcio (2018). "Subretinal drusenoid deposits AKA pseudodrusen." Survey of Ophthalmology **63**(6): 782-815.

Spaide, R. F., L. Yannuzzi, K. B. Freund, R. Mullins and E. Stone (2019). "EYES WITH SUBRETINAL DRUSENOID DEPOSITS AND NO DRUSEN: Progression of Macular Findings." Retina **39**(1): 12-26.

Staurengi, G., S. Sadda, U. Chakravarthy and R. F. Spaide (2014). "Proposed lexicon for anatomic landmarks in normal posterior segment spectral-domain optical coherence tomography: the IN•OCT consensus." Ophthalmology **121**(8): 1572-1578.

Takahashi, R., H. Yokoji, H. Misawa, M. Hayashi, J. Hu and T. Deguchi (1994). "A null mutation in the human CNTF gene is not causally related to neurological diseases." Nature Genetics **7**(1): 79-84.

Tao, W., R. Wen, M. B. Goddard, S. D. Sherman, P. J. O'Rourke, P. F. Stabila, W. J. Bell, B. J. Dean, K. A. Kauper, V. A. Budz, W. G. Tsiaras, G. M. Acland, S. Pearce-Kelling, A. M. Laties and G. D. Aguirre (2002). "Encapsulated cell-based delivery of CNTF reduces photoreceptor degeneration in animal models of retinitis pigmentosa." Invest Ophthalmol Vis Sci **43**(10): 3292-3298.

Tao, W., R. Wen, M. B. Goddard, S. D. Sherman, P. J. O'Rourke, P. F. Stabila, W. J. Bell, B. J. Dean, K. A. Kauper and V. A. Budz (2002). "Encapsulated cell-based delivery of CNTF reduces photoreceptor degeneration in animal models of retinitis pigmentosa." Investigative ophthalmology & visual science **43**(10): 3292-3298.

Uhl, M., C. Althoefer, U. Kontny, K. Il'yasov, M. Büchert and M. Langer (2002). "MRI-diffusion imaging of neuroblastomas: first results and correlation to histology." European Radiology **12**(9): 2335-2338.

Vajzovic, L., A. E. Hendrickson, R. V. O'Connell, L. A. Clark, D. Tran-Viet, D. Possin, S. J. Chiu, S. Farsiu and C. A. Toth (2012). "Maturation of the Human Fovea: Correlation of Spectral-Domain Optical Coherence Tomography Findings With Histology." American Journal of Ophthalmology **154**(5): 779-789.e772.

Velthoven, M. v., B. Willekens, F. Verbraak, K. d. Vos and M. d. Smet (2004). "Histological correlation of en-face OCT scans using a porcine retina." Investigative Ophthalmology & Visual Science **45**(13): 2371-2371.

Volland, S., J. Esteve-Rudd, J. Hoo, C. Yee and D. S. Williams (2015). "A comparison of some organizational characteristics of the mouse central retina and the human macula." PloS one **10**(4): e0125631.

Wen, R., W. Tao, Y. Li and P. A. Sieving (2012). "CNTF and retina." Progress in Retinal and Eye Research **31**(2): 136-151.

WMA, G. (2013). "WMA Declaration of Helsinki - Ethical principles for medical research involving human subjects." Retrieved 08.06.2020, from <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>.

Xie, W., M. Zhao, S. H. Tsai, W. L. Burkes, L. B. Potts, W. Xu, H. R. Payne, T. W. Hein, L. Kuo and R. H. Rosa, Jr. (2018). "Correlation of spectral domain optical coherence tomography with histology and electron microscopy in the porcine retina." Exp Eye Res **177**: 181-190.

Zanzottera, E. C., J. D. Messinger, T. Ach, R. T. Smith, K. B. Freund and C. A. Curcio (2015). "The Project MACULA retinal pigment epithelium grading system for histology and optical coherence tomography in age-related macular degeneration." Investigative ophthalmology & visual science **56**(5): 3253-3268.

Zarubina, A. V., D. C. Neely, M. E. Clark, C. E. Huisingh, B. C. Samuels, Y. Zhang, G. McGwin, Jr., C. Owsley and C. A. Curcio (2016). "Prevalence of Subretinal Drusenoid Deposits in Older Persons with and without Age-Related Macular Degeneration, by Multimodal Imaging." Ophthalmology **123**(5): 1090-1100.

Zhang, K., J. J. Hopkins, J. S. Heier, D. G. Birch, L. S. Halperin, T. A. Albin, D. M. Brown, G. J. Jaffe, W. Tao and G. A. Williams (2011). "Ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for treatment of geographic atrophy in age-related macular degeneration." Proceedings of the National Academy of Sciences **108**(15): 6241-6245.

Zhang, K., J. J. Hopkins, J. S. Heier, D. G. Birch, L. S. Halperin, T. A. Albin, D. M. Brown, G. J. Jaffe, W. Tao and G. A. Williams (2011). "Ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for treatment of geographic atrophy in age-related macular degeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(15): 6241-6245.

Zhu, S., M. Yam, Y. Wang, J. D. Linton, A. Grenell, J. B. Hurley and J. Du (2018). "Impact of euthanasia, dissection and postmortem delay on metabolic profile in mouse retina and RPE/choroid." Exp Eye Res **174**: 113-120.

Zweifel, S. A., M. Engelbert, K. Laud, R. Margolis, R. F. Spaide and K. B. Freund (2009). "Outer Retinal Tubulation: A Novel Optical Coherence Tomography Finding." Archives of Ophthalmology **127**(12): 1596-1602.

Zysk, A. M., F. T. Nguyen, A. L. Oldenburg, D. L. Marks and S. A. Boppart (2007). "Optical coherence tomography: a review of clinical development from bench to bedside." Journal of biomedical optics **12**(5): 051403.

I Abkürzungsverzeichnis

AF	Autofluoreszenz
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
AREDS	Age-Related Eye Disease Study
BAF	Blau-Autofluoreszenz
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CNTFR α	CNTF-Rezeptor- α
cSLO	Confocal Scanning Laser Ophthalmoscopy
DAPI	4',6-Diamidine-2'-phenylindole-dihydrochloride
ECT	Encapsulated Cell Technology
ELM	Externe Limitierende Membran
GA	Geographische Atrophie
IL	Interleukin
IR	Infrarot
Mac Tel 2	Makuläre Teleangiektasien Typ 2
NIR	Nah-Infrarot
O.C.T.	Optimal Cutting Temperature Compound, Tissue Tek
OCT	Optische Kohärenztomographie
ORT	Outer Retinal Tubulations
PAS	Periodic Acid Schiff Reaction Method
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
RF	Rotfrei
RPE	Retinales Pigmentepithel
SDD	Subretinal Drusenoid Deposits
SD-OCT	Spectral Domain – Optische Kohärenztomographie
UKW	Universitätsklinikum Würzburg
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Physiologischer OCT-Schnitt durch die Fovea	4
Abbildung 2: Ex vivo Präparation	15
Abbildung 3: Ex vivo Präparation eines zentralen Gewebegürtels	17
Abbildung 4: Herstellung von Gefrierschnitten und Orientierung im Gewebe	18
Abbildung 5: Arbeitsablauf an der Augenklinik des UKW	22
Abbildung 6: Präoperative in vivo Bildgebung	23
Abbildung 7: Präoperative in vivo SD-OCT-Bildgebung	24
Abbildung 8: Multimodale postoperative ex vivo Bildgebung	26
Abbildung 9: Aufbau für die multimodale postoperative ex vivo Bildgebung	27
Abbildung 10: Korrelation der in vivo/ ex vivo OCT: Fovea	28
Abbildung 11: Korrelation der in vivo/ ex vivo OCT: Parafovea	28
Abbildung 12: Multimodale postoperative ex vivo Bildgebung: Fluoreszenz	29
Abbildung 13: Histologische Übersichtsfärbung mit PAS	30
Abbildung 14: Anfärbung humaner Retina mit CNTF-Immunfluoreszenzfärbung	33

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gegenüberstellung der Spenderaugen und vergleichender Arbeitsablauf ..	32
--	----

IV Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit oder auf dem Weg dorthin unterstützt haben.

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. Hillenkamp für die Möglichkeit, an der Augenklinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg wissenschaftlich tätig zu sein und diese Arbeit anfertigen zu dürfen.

Insbesondere geht mein Dank an meinen Doktorvater PD Dr. Thomas Ach für die ausgezeichnete Hilfe und Unterstützung und die spannenden Themen, die wir in den letzten Jahren zusammen bearbeiten durften. Besonders die regelmäßige Begleitung und die motivierenden Gespräche auf fachlicher und persönlicher Ebene waren mir das beste Mentoring, das ich mir wünschen konnte. Herr Dr. Ach hat seine Begeisterung für die Wissenschaft mit großem Erfolg an seine Doktorandinnen und Doktoranden weitergegeben.

Mein Dank geht des Weiteren an Christine Schmitt für die großartige wissenschaftliche Zusammenarbeit, die stetige Unterstützung und viele Ratschläge.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Christine Curcio und Jeffrey Messinger für die internationale Zusammenarbeit und die intensiven Einblicke in moderne Methoden und spannende wissenschaftliche Projekte.

Meinen Eltern und meinem Bruder möchte ich ganz besonders danken für die liebevolle Unterstützung, Motivation und das Interesse an meiner Arbeit und während des gesamten Studiums.

Zu guter Letzt danke ich meinem Mann Michael für die Geduld und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit.

V Eigene Veröffentlichungen

Stockinger P, Berlin A, Kampik D, Schmitt C, Hillenkamp J, Messinger JD, Herwig-Carl MC, Ach T (2021). Correlation of in vivo/ex vivo imaging of the posterior eye segment. *Ophthalmologe*, **118**(Suppl 2):153-159.

Stockinger P, Berlin A, Kampik D, Schmitt C, Hillenkamp J, Messinger JD, Herwig-Carl MC, Ach T (2020). Methode zur vergleichenden *in vivo/ex vivo* Bildgebung des hinteren Augenabschnitts. *Ophthalmologe*, **117**(12): 1188-1195.

Ach, T., **Stockinger, P.**, Schmitt, C., Curcio, C. A., Sendtner, M., & Hillenkamp, J. (2018). Ciliary neurotrophic factor (CNTF) in the retina: age and disease related expression in humans and mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **59**(9): 3104-3104.

Ach, T., Bermond, K., **Stockinger, P.**, Schmitt, C., Sendtner, M., Hillenkamp, J. (2017): Humanes retinales Pigmentepithel: Normales Alterung, degenerative Veränderungen, protektive Faktoren. Lebendige Wissenschaft, Spitzenforschung in der Ophthalmologie, DOG, ISSN: 1861-4620 / Ausgabe 2017, 69-517.

VI Patientenaufklärung zur Studienteilnahme

Universitätsklinikum Würzburg

Augenklinik und Poliklinik
Direktor: Prof. Dr. med. J. Hillenkamp



Informationsblatt zur Studie:

Nutzung von Augen-Gewebespenden der Hornhautbank für die Forschung: Regeneration und mikroskopische Untersuchungen des retinalen Pigmentepithels

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

wir möchten Sie fragen, ob Sie mit der Weiterverwendung von entnommenem Gewebe für die wissenschaftliche Forschung bereit sind (normalerweise wird entnommenes Gewebe, das nicht weiter medizinisch untersucht wird, verworfen). Dieses Informationsblatt informiert Sie, worum es bei dieser Forschung geht. Für weitere Fragen stehen wir Ihnen jederzeit selbstverständlich gern zur Verfügung.

1. Warum wird diese Forschung durchgeführt?

Wir sind an einem weiteren Verständnis zu normalen altersbedingten Veränderungen als auch krankheitsbedingten Veränderungen des Auges interessiert. Um diese Untersuchungen durchführen zu können, benötigen wir menschliches Material, da Erkenntnisse aus Tiermodellen nur schwer auf den Menschen übertragbar sind.

Ziel ist es, das entnommene Augengewebe für histologische und mikroskopische Untersuchungen einzusetzen.

2. Nutzen der Forschung

Aus den Forschungen erhoffen wir uns Erkenntnisse darüber, wie sich Augengewebe, speziell die Netzhaut und angrenzende Schichten, im Alter und bei Erkrankungen verändert. Die im Rahmen dieser Forschungen gewonnenen Erkenntnisse können u.a. zur Entwicklung und Testung alter oder neuer Wirkstoffe sowie zur Testung neuer Behandlungsverfahren dienen.

3. Was genau passiert mit dem Restgewebe?

Gewebe, das nach der Entnahme nicht für weitere medizinische Untersuchungen benötigt wird, wird normalerweise entsorgt. Wir würden dieses Gewebe in einem Plastikgefäß mit einer speziellen Fixierlösung einlegen und in unseren Laborräumen aufbewahren. Das Gewebe wird dabei pseudonymisiert gelagert, das heißt, weder Ihr Name noch Ihr Geburtsdatum sind hieraus ersichtlich. Teile des Gewebe werden unter Berücksichtigung der entsprechenden

Augenklinik und Poliklinik
Josef-Schneider-Straße 11 – Haus B2
97080 Würzburg

Tel.: (09 31) 2 01 – 20 351
www.klinik.uni-wuerzburg.de



Das Klinikum ist mit der Straßenbahn, Linie 1 und 5 (Richtung Grombühl), Haltestelle Robert-Koch-Str. (Uniklinikum B und C), zu erreichen.

Sicherheitsvorschriften zum Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin befördert und untersucht.

4. Einwilligung zur Gewebespende

Sie spenden Ihr Gewebe für wissenschaftliche Zwecke. Dies setzt Ihre schriftliche Einwilligung voraus. Diese Einwilligung kann jedoch von Ihnen jederzeit, ohne Angaben von Gründen und ohne das Ihnen daraus Nachteile entstehen, widerrufen werden. Ein Widerruf hat auch keine Auswirkungen auf Ihre weitere medizinische Behandlung.

Mit der Teilnahme an dieser Studie entstehen Ihnen keine Rechte an den Forschungsergebnissen, insbesondere können Sie keine Entgelte oder Ähnliches fordern.

5. Datenschutz

Die bei der Durchführung der Studie erhobenen Daten, insbesondere medizinische Befunde, werden in pseudonymisierter Form gespeichert und ausgewertet. Die Verwendung der Angaben setzt vor der Teilnahme an der Studie folgende freiwillig abgegebene Einwilligungserklärung voraus. Ohne die nachfolgende Einwilligung können Sie nicht an der Studie teilnehmen.

Die pseudonymisierten Daten werden 10 Jahre gespeichert. Danach werden die Daten anonymisiert und personenidentifizierende Daten gelöscht. Bei einem Widerruf der Studienteilnahme werden die erhobenen Studiendaten anonymisiert und personenidentifizierende Daten gelöscht, außer Sie stimmen einer weiteren Verwendung Ihrer pseudonymisierten Daten gesondert zu (erneute Einwilligung).

Bei Widerruf Ihrer Einwilligung werden die Gewebeproben unwiderruflich vernichtet werden.

Dritte erhalten keinen Einblick in personenbezogene Unterlagen. Ergebnisse dieser Studie werden nur in anonymisierter Form veröffentlicht.

Bitte fragen Sie, wenn Sie etwas nicht verstanden haben, oder wenn Sie mehr über die Untersuchung wissen möchten. Fragen Sie bitte bei allem nach, was Ihnen wichtig erscheint.



EINWILLIGUNGSERKLÄRUNG: Nutzung von Augen-Gewebespenden für die Forschung: Regeneration und mikroskopische Untersuchungen des retinalen Pigmentepithels. (Gewebe/Version03/20180210)

Name des Patienten: _____

Geburtsdatum: _____

Mit meiner Unterschrift bestätige ich, dass

- ich das Informationsblatt zu der oben genannten Studie gelesen habe, dass mir die Studie mündlich erklärt wurde und ich ausreichend Gelegenheit hatte, Fragen zu stellen.
- ich eine Kopie der Einverständniserklärung erhalten habe.
- meine Entscheidung zur Teilnahme an dieser Studie auf absolut freiwilliger Basis erfolgt. Ich kann mich jederzeit anders entscheiden, ohne Angabe von Gründen, und aus der Studie ausscheiden, ohne dass dies Nachteile für mich oder einen Einfluss auf meine medizinische Betreuung oder Rechte hat.
- ich bereit bin, im Rahmen der Studie von mir entnommenes Augen-Gewebe für wissenschaftliche Zwecke zu spenden.

Datenschutz

Bei der Durchführung der Studie werden von Ihnen Daten erhoben, insbesondere medizinische Befunde, die in pseudonymisierter Form gespeichert und ausgewertet werden sollen. Die Verwendung der Angaben setzt vor der Teilnahme an der Studie Ihre folgende freiwillig abgegebene Einverständniserklärung voraus. Ohne die nachfolgende Einwilligung können Sie nicht an der Studie teilnehmen.

Dritte erhalten jedoch keinen Einblick in personenbezogene Unterlagen. Bei der Veröffentlichung von Ergebnissen der Studie wird Ihr Name ebenfalls nicht genannt, Daten werden hier anonymisiert dargestellt.

Die pseudonymisierten Daten werden 10 Jahre gespeichert. Danach werden die Daten anonymisiert und personenidentifizierende Daten gelöscht.

Bei einem Widerruf der Studienteilnahme werden die erhobenen Studiendaten anonymisiert und personenidentifizierende Daten gelöscht, außer ich stimme einer weiteren Verwendung meiner pseudonymisierten Daten gesondert zu. Bei einem Widerruf werden die Gewebespenden unwiederbringlich vernichtet.

Mit meiner Unterschrift bestätige ich zudem, dass

- ich diese Datenschutzrichtlinien verstanden habe und diesen zustimme.



Ggf weitere Gesprächsinhalte/Fragen:

Unterschrift des Patienten:

Vor- und Nachname (in Druckschrift): _____

Unterschrift: _____

Datum: _____

Unterschrift des/der aufklärenden Arztes/Ärztin:

Vor- und Nachname (in Druckschrift): _____

Unterschrift: _____

Datum: _____

Kontaktadresse

Dr. med. Daniel Kampik, PD Dr. med. Thomas Ach
Universitätsklinikum Würzburg, Augenlinik und Poliklinik
Josef-Schneider-Straße 11, 97080 Würzburg
T: 0931-201-20458 (Studienambulanz)