

Aus der Augenklinik und Poliklinik der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. A. Kampik

Epiretinale Membranen
Die Ultrastruktur nach Anwendung von Kryomethoden und
chemischer Fixierung

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ricarda Schumann
aus Altdöbern

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. A. Kampik
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. H. Kretzschmar Prof. Dr. med. A. Mayerhofer Prof. Dr. med. J. Müller-Höcker Prof. Dr. med. M. Schliwa
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. med. A. Gandorfer
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	02.12.2004

Meinen lieben Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Fragestellung	1
1.2 Epiretinale Membranen	2
1.2.1 Terminologie und Epidemiologie	2
1.2.1.1 Synonym verwendete Begriffe	2
1.2.1.2 The Beaver Dam Eye Study	2
1.2.2 Aufbau und Funktion der vitreoretinalen Grenzfläche	3
1.2.2.1 Der Glaskörper	3
1.2.2.2 Die Membrana limitans interna	4
1.2.3 Klinische Gesichtspunkte epiretinaler Membranen	4
1.2.3.1 Assoziation epiretinaler Membranen mit vitreoretinalen Erkrankungen	4
1.2.3.2 Klinische Erscheinung und diagnostische Möglichkeiten	5
1.2.3.3 Die hintere Glaskörperabhebung	6
1.2.3.4 Therapeutische Intervention	6
1.2.4 Ultrastrukturelle Charakterisierung epiretinaler Membranen	7
1.2.4.1 Beschreibung zellulärer Komponenten	7
1.2.4.2 Bestandteile der extrazellulären Matrix	8
1.2.5 Immunhistochemische und immunzytochemische Analysen	8
1.2.5.1 Zellidentifikation mittels spezifischer Zellmarker	8
1.2.5.2 Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren	9
1.2.5.3 Extrazelluläre Proteine und ihre Bedeutung für die Pathogenese	10
1.2.6 Konzepte zur Pathogenese – Die Suche nach den Schlüsselfaktoren	12
1.2.6.1 Gliose und Fibrose	12
1.2.6.2 Adhäsion und Migration	13
1.2.6.3 Proliferation und Kontraktion	13
1.3 Gewebeaufbereitung für die Elektronenmikroskopie	15
1.3.1 Konventionelle Präparationsverfahren	15
1.3.1.1 Chemische Fixierung	15
1.3.1.2 Dehydrierung	17

II

1.3.1.3	Einbettung und Polymerisation	17
1.3.2	Die Kryomethoden	18
1.3.2.1	Kryofixierung	19
1.3.2.2	Gefriersubstitution	21
1.3.2.3	Einbettung und Polymerisation	21
2. MATERIAL UND METHODEN		23
2.1	Präparationsablauf	23
2.1.1	Fixierung	24
2.1.1.1	Kryofixierung	24
2.1.1.2	Modifizierte chemische Fixierung	25
2.1.2	Entwässerung	27
2.1.2.1	Gefriersubstitution	27
2.1.2.2	Konventionelle Dehydrierung	28
2.1.3	Einbettung und Polymerisation	28
2.1.3.1	Infiltration kryofixierter Präparate	28
2.1.3.2	Infiltration chemisch fixierter Präparate	29
2.1.4	Mikrotomie und Mikroskopie	30
2.1.4.1	Semidünnschnitte	30
2.1.4.2	Ultradünnschnitte	31
3. ERGEBNISSE		32
3.1	Beschreibung lichtmikroskopischer Aufnahmen	32
3.1.1	Präparate der Kryofixierung	32
3.1.1.1	Trägersubstanz und Dünnschnittqualität	32
3.1.1.2	Differenzierbarkeit epiretinalen Gewebes	32
3.1.2	Präparate der chemischen Fixierung	34
3.1.2.1	Dünnschnittqualität und Schichtung epiretinalen Gewebes	34
3.1.2.2	Zelluläre Details chemisch fixierter epiretinaler Membranen	34

3.2	Beschreibung elektronenmikroskopischer Aufnahmen	36
3.2.1	Präparate der Kryofixierung	36
3.2.1.1	Differenzierbarkeit der Membrankomponenten	36
3.2.1.2	Zelluläre und extrazelluläre Details	38
3.2.2	Präparate der chemischen Fixierung	40
3.2.2.1	Aufbau epiretinaler Membranen	40
3.2.2.2	Differenzierung intrazellulärer Komponenten	42
4.	DISKUSSION	44
4.1	Überlegungen zu Ergebnis und Intention der Arbeit	44
4.1.1	Auswertung der Ergebnisse	44
4.1.1.1	Morphologischer Vergleich kryofixierter und chemisch fixierter ERM	44
4.1.1.2	Bewertung der Präparationsverfahren	46
4.1.2	Einordnung der Ergebnisse in die Literatur	47
4.1.2.1	Fixierung epiretinaler Membranen	47
4.1.2.2	Immunzytochemie und Immunhistochemie	47
4.2	Überlegungen zu Technik und Methodik	48
4.2.1	Technische Probleme	48
4.2.1.1	Trägersubstanz	48
4.2.1.2	Gefrierschutz	49
4.2.2	Methodische Details	50
4.2.2.1	Kryofixierung	50
4.2.2.2	Chemische Fixierung	51
4.2.2.3	Entwässerung	52
4.2.2.4	Einbettung	54
4.2.2.5	Polymerisation	55
4.2.2.6	Kontrastierung	56
4.3	Umsetzung der Ergebnisse	56
4.3.1	Protokollvorschläge für Kryotechniken	56
4.3.1.1	Trägersubstanz	57
4.3.1.2	Gefrierschutz	58

IV

4.3.1.3	Gefriersubstitution	58
4.3.1.4	Einbettung und Polymerisation	59
4.3.1.5	Kontrastierung	59
4.3.2	Protokollvorschläge für chemische Präparationsverfahren	59
4.3.2.1	Methode des ‚Progressive-Lowering of Temperature‘	59
4.3.2.2	Infiltration des Einbettmediums	60
5.	ZUSAMMENFASSUNG	61
	Literaturverzeichnis	63
	Liste der Abkürzungen	71

1. EINLEITUNG

1.1 Fragestellung

Durch eine Vielzahl licht- und elektronenmikroskopischer Untersuchungen sind in der Vergangenheit Aufbau, Zusammensetzung und Vielfalt epiretinaler Membranen exakt und ausführlich beschrieben worden, worauf noch immer das Wesentliche unseres derzeitigen Verständnisses von vitreoretinalen Netzhautproliferationen beruht. Forschungsmethoden wie immunzytochemische Nachweisverfahren erweitern seit einigen Jahren die Aussagekraft elektronenmikroskopischer Auswertungen. Sie besitzen das Potenzial, unbekanntes zelluläre Komponenten zu definieren oder spezifische Molekülstrukturen innerhalb einer Zelle zu lokalisieren. Die Gewebeaufbereitung bei immunzytochemischen Fragestellungen verlangt die Anwendung anderer Präparationsmethoden als bei ultrastrukturellen Untersuchungen, da oft die Antigenität des Gewebes durch die Chemikalien standardisierter, konventioneller Präparationsverfahren zerstört wird. Die meisten schonenden Verfahren, welche die antigenen Strukturen eines Gewebes nicht zerstören würden, resultieren jedoch in einer schlecht erhaltenen Ultrastruktur. Hierin besteht die Problematik der vorliegenden Arbeit, deren Anliegen es ist, für dieses Missverhältnis der Gewebeaufbereitung immunzytochemischer Untersuchungen einen Kompromiss zu finden.

Sowohl die Anwendung von Kryomethoden als auch milde, chemische Präparationsverfahren versprechen gemäss Theorie und Literatur die Antigenität zu erhalten. Ungewiss ist aber ihre Eignung zur Aufbereitung epiretinaler Membranen hinsichtlich ultrastruktureller Erhaltung und Reproduzierbarkeit. Deshalb war Ziel dieser Arbeit, den Einsatz von Kryotechniken und chemischer Präparation zu vergleichen und möglichst ein geeignetes Verfahren zu eruiieren, welches potenziell die Antigenität epiretinaler Membranen bewahrt und nachweislich die Feinstruktur auf eine solche Weise erhält, dass eine detaillierte und zufriedenstellende elektronenmikroskopische Auswertung gewährleistet werden kann.

Da die Fixierungsmethode immer den ersten Schritt in der Präparation biologischen Materials für die Elektronenmikroskopie darstellt und intra- sowie extrazelluläre Komponenten für das weitere Prozedere stabilisiert, kommt ihr eine zentrale Bedeutung in der Erhaltung von Antigenität und Ultrastruktur zu. Sie entspricht deshalb in den hier gegenübergestellten Präparationsverfahren der unabhängigen Variable. Die nachfolgenden Präparationsschritte wurden weitgehend einheitlich durchgeführt. Zum Einsatz kamen die Kryofixierung als „Plunging“ oder „Impact Freezing“ und die milde chemische Fixierung mit einem Gemisch aus 2% Paraformaldehyd und 0,05% Glutaraldehyd. Auf eine Postfixierung mit Osmiumtetroxid wurde verzichtet. Die licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen

der unterschiedlich präparierten epiretinalen Membranen sind anschließend miteinander verglichen worden. Die Bewertung der Morphologie richtete sich dabei nach der Definierbarkeit der Membrankomponenten sowie der extra- und intrazellulären Bestandteile.

1.2 Epiretinale Membranen

Nahezu eineinhalb Jahrhunderte sind seit den ersten Beschreibungen epiretinaler Membranen vergangen. Noch im Jahr 1865 berichtete Iwanoff in nur wenigen Worten über die „zwischen dem Glaskörper und der Retina (...) befindlichen Theile“ [Iwanoff, 1865], während Parsons im Jahr 1905 bereits detaillierter auf die fibrozellulären Proliferationen einging, die sich in unterschiedlichen klinischen Situationen an der vitreoretinalen Grenzfläche bilden können [Parsons, 1905].

1.2.1 Terminologie und Epidemiologie

1.2.1.1 Synonym verwendete Begriffe

Der Terminus für die fibrozellulären Proliferationen an der Fläche zwischen innerer Grenzmembran und Glaskörperrinde änderte sich im Verlauf der Jahrzehnte beständig. Unter der Vielzahl synonym verwendeter Begriffe hat sich heute die Bezeichnung „epiretinale Membranen“ durchgesetzt [Parsons, 1905], aber auch „vitreoretinale Membranen“ [Heidenkummer, 1992], „epiretinale Gliose“ [Spitznas, 1977; Sidd, 1982], „surface wrinkling retinopathy“ [Roth, 1971], „preretinal macular fibrosis“ [Wise, 1975], „cellophane maculopathy“ [Jaffe, 1967] und „macular pucker“ [Tannenbaum, 1979] sind gängige Begriffe. Die Termini „cellophane maculopathy“ und „surface wrinkling retinopathy“ werden benutzt, um das Auftreten dünner epiretinaler Membranen zu beschreiben. Der Begriff „macular pucker“ wird für epiretinale Membranen verwendet, die Visusverlust und Torsion der Retinaschichten verursachen.

Eine von Gass vorgeschlagene Klassifikation epiretinaler Membranen teilt diese in Grad 0 ein [Gass, 1987], wenn sie lichtdurchlässig erscheinen, aber noch keinerlei Verzerrung der retinalen Schichten bewirken. Bei Grad 1 sind die oberflächlichen Schichten der Retina zu unregelmäßigen Falten aufgeworfen. Der Zustand „macular pucker“ entspricht Grad 2 und beschreibt eine opake, undurchsichtige, trübe Membran, die auch Traktionen und Torsionen der Netzhautgefäße hervorruft.

1.2.1.2 The Beaver Dam Eye Study

Die Beaver Dam Eye Studie von 1988-1990 war die erste Bevölkerungs-basierende Untersuchung, die anhand großer Fallzahlen die Prävalenz, die Assoziation zu Risikofaktoren und den Effekt auf die Sehschärfe analysierte [Klein, 1994]. Bis zu diesem

Zeitpunkt war die Häufigkeit des Auftretens epiretinaler Membranen nur durch eine Vielzahl kleinerer, klinischer Studien beschrieben worden [Wise, 1975a; Noble, 1982; Sidd, 1982; Clarkson, 1977; Roth, 1971]. Von insgesamt 4926 untersuchten Teilnehmern in Beaver Dam, Wisconsin, im Alter von 43 bis 84 Jahren konnten in 11,8% unilateral und in 2,4% bilateral auftretende epiretinale Membranen gefunden werden. Wurden alle Teilnehmer mit retinalen Vorerkrankungen, rhegmatogenen Netzhautablösungen, diabetischer Retinopathie oder vorausgegangener Kataraktoperation ausgeschlossen wurden, so ließ sich eine Prävalenz von 10,9% postulieren. Des weiteren konnte die in vorausgegangenen Studien aufgedeckte Altersabhängigkeit erneut bestätigt werden. 2,7% der Personen zwischen 43 und 54 Jahren und 12,8% der über 75-Jährigen wiesen epiretinale Membranen auf. Eine Beziehung zu Geschlecht, Bluthochdruck, Katarakt, Glaukom oder Nikotinabusus war aus den Ergebnissen nicht abzuleiten.

1.2.2 Aufbau der vitreoretinalen Grenzfläche

Die Ultrastruktur der Verbindung zwischen Glaskörper und Retina setzt sich aus zwei Elementen zusammen: (1) aus kondensierten Kollagenfibrillen der hinteren Glaskörperrinde und (2) aus der Membrana limitans interna, die üblicherweise auch als „inner limiting membrane“ (ILM) bezeichnet wird und die Basalmembran der Müller Zellen darstellt [Heegaard, 1997].

1.2.2.1 Der Glaskörper

Die Gel-artige Konsistenz des Glaskörpers ist durch dessen hohen Wassergehalt von ungefähr 97% bis 99% bedingt, der verbleibende Teil entspricht Kollagenfibrillen, löslichen Proteinen und Glykosaminoglykanmolekülen, bestehend aus Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat [Scott, 1992; Heegaard, 1997]. Die exakte, Netzwerk-ähnliche Anordnung dieser Komponenten gewährleistet die Transparenz des Glaskörpers. Neben oben genannten biochemischen Komponenten sind in der Glaskörperrinde auch Zellen zu finden. Diese Glaskörperzellen, auch ‚Hyalozyten‘ genannt, liegen verstreut in einer bestimmten Schicht der Glaskörperrinde ungefähr 20 µm bis 50 µm von der ILM entfernt [Sebag, 1992]. Hyalozyten verfügen über phagozytäre Eigenschaften und sollen an pathologischen Veränderungen des Auges wie der Bildung epiretinaler Membranen beteiligt sein [Grabner, 1980; Kampik, 1981a]. In der Glaskörperrinde wurden vereinzelte Fibroblasten gefunden, die aber weniger als 10% der vitrealen Zellpopulation ausmachen [Sebag, 1992]. Die Ultrastruktur zentraler, vitrealer Anteile ähnelt in ihrer Komposition grundsätzlich derjenigen der Glaskörperrinde, welche sich im Vergleich dazu jedoch aus dichter gepackten, stärker kondensierten Kollagenfibrillen zusammensetzt. Das Kollagenetzwerk verdichtet sich zur Retina hin und ist über in die ILM einstrahlende Kollagenfasern fest mit der Netzhaut verbunden. Charakteristisch für die vitreoretinale Grenzfläche sind Kollagene vom Typ I, II

und IV mit einem Durchmesser von 8 nm bis 16 nm, wobei Kollagen Typ IV als spezifischer Bestandteil von Basalmembranen vorrangig in der ILM gefunden werden kann [Marshall, 1993; Jerdan, 1986; Heegaard, 1994].

1.2.2.2 Die Membrana limitans interna

In Anlehnung an den dreischichtigen Aufbau epithelialer Basalmembranen besteht die ILM aus der Lamina lucida, der Lamina densa und aus dem, der Lamina fibroelastica entsprechenden, Glaskörperrindenanteil, dessen Kollagenfibrillen mit der Lamina densa verankert sind und vorrangig aus Typ I und IV Kollagen bestehen [Heegaard, 1997]. Typ I Kollagen kommt üblicherweise nicht in Basalmembranen vor, bewirkt jedoch eine deutliche Zunahme der Reißfestigkeit und Widerstandsfähigkeit [Jerdan, 1986]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Länge der Kollagenfasern der vitreoretinalen Grenzfläche lokal variiert und dass die längsten Kollagenfasern in der Region der Ora serrata, die kürzesten in der Region der Makula zu finden sind. Die äußere Oberfläche der ILM eines Erwachsenen ist unregelmäßig gewellt, die dem Glaskörper zugewandte Seite hingegen glatt begrenzt [Heegaard, 1994]. Die ILM dient nicht nur als physikalische Barriere für Zellen und Moleküle, sondern trägt in entscheidendem Maß auch zur Verankerung des Glaskörpers mit der Netzhaut bei [Gilbert, 1988].

1.2.3 Klinische Gesichtspunkte epiretinaler Membranen

In der Mehrzahl der Fälle bilden sich epiretinale Membranen (ERM) unbemerkt. Solange die Region der Makula nicht betroffen ist, entwickelt sich keine klinische Symptomatik und die Bildung epiretinaler Membranen bleibt für den Patienten asymptomatisch. Auch wenn es sich um eine dünne, einfache, epimakuläre Membran handelt, können die Symptome ausbleiben. Erst bei Fortschreiten der Krankheit und Ausbildung dickerer, komplexer, epiretinaler Membranen werden die Patienten durch Abnahme der Sehschärfe, Verschwommensehen, Metamorphopsien, Mikropsien oder Photopsien auffällig. Die Symptomatik variiert von Fall zu Fall in Abhängigkeit von Ort und Ausmaß der retinalen Schädigung. Bei ungünstigem Verlauf schreitet der Kontraktionsprozess der Membranbildung so weit fort, dass retinale Traktionen mit Netzhautablösungen entstehen, welche wiederum zu Gesichtsfelddefekten und schließlich Blindheit führen können.

1.2.3.1 Assoziation epiretinaler Membranen mit vitreoretinalen Erkrankungen

Einerseits treten epiretinale Membranen bei einer Vielzahl von okulären Störungen oder vitreoretinalen Erkrankungen auf, andererseits auch ohne erkennbare Zusammenhänge. Nach ihrer Ätiologie können sie klassifiziert werden in [McLeod, 1987; Noble, 1982; Appiah, 1989; Fine, 1977; Jahn, 2001]:

- a) Idiopathische ERM: Ein Großteil der epiretinalen Membranen tritt ohne prädisponierende Faktoren oder okulärer Abnormalitäten auf.
- b) Sekundäre ERM: Dieser Terminus beschreibt das Auftreten ERM im Zusammenhang mit retinalen, vaskulären Störungen (z.B. Zentralvenenverschuß), diabetischer Retinopathie, retinaler Vaskulitis (z.B. Sarkoidose), Entzündungen wie Uveitis, retinalen Dystrophien wie Retinitis pigmentosa, vitrealen Hämorrhagien, Trauma.
- c) Iatrogene ERM: Eine Vielzahl von Interventionen kann mit der Bildung ERM einhergehen, so z.B. Kryopexie, Photokoagulation oder intraokuläre Chirurgie wie extrakapsuläre Kataraktoperation oder Vitrektomie bei Netzhautablösung.

1.2.3.2 Klinische Erscheinung und diagnostische Möglichkeiten

Unabhängig von der jeweiligen Ätiologie der Membranen ähneln sich die klinischen Bilder wie oben beschrieben. Der Verlauf variiert jedoch zum Teil erheblich. Bei Patienten mit idiopathischen epiretinalen Membranen sinkt die Sehschärfe seltener als bei sekundären oder iatrogenen ERM unter 0,1 (20/200) und bleibt häufig über lange Zeiträume stabil [Wise, 1975a]. Schwerer Visusverlust und schnell progressiver Verlauf ist typischer für iatrogene und rekurrende ERM, während die Abnahme der Sehschärfe sekundär entstandener ERM oft hauptsächlich durch die assoziierte Störung bzw. Erkrankung verursacht wird [McLeod, 1987]. Epiretinale Membranen mindern die Sehschärfe durch unterschiedliche Mechanismen [Michels, 1981]:

- 1) durch die Membran an solche, sollte sie die Makula überdecken und verzerren.
- 2) durch vaskuläre Leckage mit konsekutivem Makulaödem.
- 3) durch die Verlegung des neuronalen axoplasmatischen Flusses.
- 4) und durch beginnende Netzhautablösung infolge schwerer Traktionen

Die makroskopische Erscheinung der betroffenen Netzhautregion hängt von den Eigenschaften der darüber liegenden Membran und vom Zustand der darunter liegenden Retinaschichten ab. Die Diagnose eines frühen Stadiums epiretinaler Membranen ist häufig ein Zufallsbefund bei ophthalmoskopischen oder biomikroskopischen Untersuchungen und verrät sich dem aufmerksamen Betrachter oft nur durch einen schimmernden Reflex, wässrig-silbern oder seidig-glänzend [Wise, 1975a]. Schon eine einzige Zellschicht kann sich auf diese Weise bemerkbar machen [Bellhorn, 1975]. Komplexere, kontrahierte ERM sind von weißer oder grauer Farbe und falten die retinalen Schichten in unterschiedlichster

Ausprägung. Die entstehenden Traktionslinien sind leicht zu erkennen, entweder als sternförmig, radiäre Falten ausgehend von einem oder mehreren Foci oder als irreguläre, breite Streifen. Gelegentlich treten auch „Cotton-wool spots“ als Orte lokaler Ödementwicklung oder harte Exsudate als Orte lokaler Lipidablagerungen sowie Hämorrhagien und Mikroaneurysmata auf [Wise 1975a]. Wenn die Erkrankung fortschreitet, kommt es zu einer Dilatation und Torsion retinaler Gefäße. Ein Netzhautödem ist mit einem progressiveren Krankheitsverlauf assoziiert und prognostisch ungünstig [Wise, 1975a; Noble, 1982; Sidd, 1982].

1.2.3.3 Die hintere Glaskörperabhebung

Die hohe Inzidenz kompletter, partieller oder lokaler hinterer Glaskörperabhebungen bei Patienten mit idiopathischen epiretinalen Membranen wird durch zahlreiche klinische und pathologische Studien belegt und liegt bei 60% bis 90% der Fälle [Wise, 1975a; Sidd, 1982]. Vielfach wird aber auch von ERM berichtet, die bei anliegendem Glaskörper und folglich scheinbar intakter vitreoretinaler Grenzfläche auftreten [Roth, 1971; Clarkson, 1977; Wise, 1975a; Sidd, 1982; Heilskov, 1996]. Dass die hintere Glaskörperabhebung eine zentrale Rolle bei der Entwicklung epiretinaler Membranen spielen könnte, wird derzeit nicht mehr bezweifelt. Eine isolierte hintere Glaskörperabhebung stellt die am häufigsten auftretende Pathologie des Glaskörpers dar und findet an der vitreoretinalen Grenze als präzise Trennung zwischen ILM der Retina und hinterer Glaskörperrinde statt [Sebag, 1991]. Wie Untersuchungen gezeigt haben, wirkt sich eine partielle, mit vitrealen Traktionen assoziierte Glaskörperabhebung negativer auf morphologische und funktionelle Befunde aus als eine komplette Glaskörperabhebung oder als ein noch anliegender Glaskörper [Hirokawa, 1986]. Der Optischen Kohärenztomographie (OCT) kommt als sensitive, diagnostische Methode für vitreoretinale Adhäsionen eine besondere Bedeutung zu. In Fällen, in denen das Auftreten einer ERM durch eine partielle hintere Glaskörperablösung mit vitreoretinalen Adhäsionen verkompliziert ist, stellt die OCT eine diagnostische Option dar. Das OCT-Bild illustriert multifokale vitreoretinale Adhäsionen und epiretinale Membranen sensitiver als biomikroskopische Untersuchungen [Gallemore, 2000].

1.2.3.4 Therapeutische Intervention

In seltenen Fällen kann ein spontanes Ablösen der epiretinalen Membranen beobachtet werden. Dies ist sowohl für idiopathische [Allen 1976] als auch für sekundäre ERM [Greven, 1988] dokumentiert worden. In jedem dieser Fälle trat zeitgleich eine spontane Verbesserung der Sehschärfe ein. Bedeutsam scheint in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass spontan aufgetretene Membranablösungen häufig mit einer gleichzeitigen hinteren Glaskörperabhebung assoziiert waren [Messner, 1977; Greven, 1988].

Heute stellt die von Machemer eingeführte Pars-plana-Vitrektomie und das Abziehen der Membranen von der Retina, das sogenannte ‚Peeling‘, die Methode der Wahl bei Patienten mit ERM dar [Machemer, 1978a]. Falten der Netzhaut glätten sich postoperativ schnell und auch Metamorphopsien vermindern sich oder verschwinden vollständig. Zahlreiche Studien bestätigen die signifikante Verbesserung der Sehkraft in 80% bis 90% der Fälle nach Entfernung epiretinalen Gewebes von der Makula [Magherio, 1985; deBustros, 1988]. Jedoch ist der Erfolg eines chirurgischen Eingriffs wesentlich von der individuellen Ausgangssituation des Patienten abhängig ist. So wurde beobachtet, dass Augen mit höherer Sehschärfe als 0,2 (20/100) nach Vitrektomie mit Peeling vergleichsweise weniger Visusverbesserung aufweisen als Augen mit schlechterem präoperativem Visus. Zusätzlich spielt die Krankheitsdauer eine große Rolle. Patienten mit seit langer Zeit beeinträchtigtem Sehvermögen profitieren weniger von einer Operation. Aus retrospektiven Studien lassen sich vier wichtige prognostische Faktoren ableiten, die mit einer Sehschärfverbesserung von 0,3 (20/60) oder mehr assoziiert sind: (1) eine Ausgangssehschärfe von mindestens 0,2; (2) eine kurze Dauer der Visusbeeinträchtigung; (3) dünne, zellophan-ähnliche Membranen sowie (4) eine noch vollständig anliegende und unbeschädigte Netzhaut [deBustros, 1988b].

1.2.4 Ultrastrukturelle Charakterisierung epiretinaler Membranen

Epiretinale Membranen ergeben in ihrer Komposition kein einheitliches Bild, denn zusätzlich zu ihrer von der Ätiologie abhängigen Erscheinung verändert sich ihre Morphologie kontinuierlich durch Proliferations- und Reifungsprozesse. Die Zellen unterliegen phänotypischen Wandlungen im Rahmen von Differenzierungs- und Dedifferenzierungsprozessen.

1.2.4.1 Beschreibung der zellulären Komponenten

Kampik et al. konnten mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) fünf verschiedene Zelltypen klassifizieren [Kampik, 1981a]: Zellen des retinalen Pigmentepithels, Fibröse Astrozyten, Fibroblasten, Makrophagen und sogenannte Myofibroblasten. Die retinalen Pigmentepithel Zellen (RPE) weisen eine Epithel-ähnliche Polarität auf. Das heißt, sie verfügen über eine Basalmembran und apikale Mikrovilli. Sie bilden junktionale Komplexe aus und ordnen sich zu Monolayern oder Rosetten-ähnlichen, azinären Strukturen. Einige der RPE Zellen besitzen Melanosomen und intrazytoplasmatische Mikrofilamente von 5 nm bis 7 nm, andere wiederum nicht. Diese unpigmentierten Zellen werden dennoch dem RPE zugerechnet, wenn sie den übrigen Kriterien der RPE Zellen entsprechen. Fibröse Astrozyten sind lange, spindelförmige Zellen, die ebenfalls durchgehende Zellschichten bilden können. Auffällig sind verzahnende Zellfortsätze und eine Vielzahl von junktionalen Komplexen sowie Intermediärfilamente von 8 nm bis 10 nm. Auch Basalmembranen und apikale Mikrovilli können auftreten. Fibroblasten sind zwar spindelförmig, aber ohne jede

Polarität. Typischerweise lassen sich in ihrem Zytoplasma prominente Golgi-Komplexe und Zisternen des rauhen endoplasmatischen Retikulums finden. Einige der Fibroblasten scheinen zu ruhen, andere befinden sich in einem aktiven, metabolischen Stadium. Makrophagen sowie Makrophagen-ähnliche Zellen zeichnen sich durch die Anwesenheit pleomorpher, intrazytoplasmatischer Einschlüsse aus. Für viele ist ein unregelmäßig gelappter Zellkern, eine Vielzahl von Residualkörpern, sekundäre Lysosomen sowie das Fehlen von Polaritätskriterien charakteristisch. Die fünfte Gruppe der Zellklassifikation, die der sogenannten Myofibroblasten, weist weniger einheitliche Merkmale auf. Gemeinsame Charakteristika sind ein stark unregelmäßiger Zellkern, sekundäre Lysosomen und zahlreiche Glykogengranula sowie das Vorhandensein intrazytoplasmatischer Mikrofilamente von 5 nm bis 7 nm mit fusiformen Verdichtungen, ein typisches Merkmal glatter Muskelzellen [Machemer, 1978]. Viele der Myofibroblasten lassen zusätzlich Eigenschaften von Fibroblasten erkennen. Als häufigste Zellart sekundärer ERM konstatierte Kampik die Gruppe der Myofibroblasten mit 91%. In 84% wurden Makrophagen und in 79% fibröse Astrozyten gefunden [Kampik, 1981b]. 77% wurden als Fibroblasten klassifiziert und nur 39% konnten als RPE Zellen eingestuft werden.

1.2.4.2 Bestandteile der extrazellulären Matrix

In gleichem Maße wie die Zusammensetzung der Zellen durch unterschiedliche ätiologische Faktoren bedingt ist, variieren auch die Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM), was sich u.a. in Qualität und Quantität der Kollagenkomponenten zeigt. Kollagen Typ II ist beispielsweise ein dominanter Bestandteil epiretinaler Membranen bei proliferativer diabetischer Retinopathie (PDR), andererseits jedoch meist fehlend in Membranen von proliferativer Vitreoretinopathie (PVR). Kollagen Typ I und III hingegen sind häufig in kontraktile Membranen zu finden [Hiscott, 2002; Schwartz, 1996]. Die Kollagenfasern bestehen häufig aus 10 nm bis 15 nm oder 20 nm bis 25 nm breiten Fibrillen. In einzelnen Fällen wurden auch bis zu 50 nm dicke Kollagenfibrillen gefunden [Kampik, 1981a]. Neben den Kollagenen gibt es eine Vielzahl von Proteinen, die sich ebenfalls an den Zell-Matrix-Interaktionen beteiligen. Hierzu zählen die adhäsiven Glykoproteine Laminin, Vitronektin und Fibronektin sowie ihre matrizellulären, anti-adhäsiven Gegenspieler Tenascin, Thrombospondin 1 und 2, Osteonectin und Osteopontin [Hiscott, 2002; Hiscott, 1993a; Kohno, 1987; Bochaton-Piallat, 2000].

1.2.5 Immunhistochemische und immunzytochemische Analysen

1.2.5.1 Zellidentifikation mittels spezifischer Zellmarker

In immunhisto- und immunzytochemischen Techniken kommen Antikörper zur Anwendung, die u.a. gegen Epitope zellulärer Strukturproteine gerichtet sind, welche im Idealfall

ausschließlich die gesuchten Zellen charakterisieren. Solche zelltyp-spezifischen Proteine wie z.B. Intermediärfilament-Proteine (IF-Proteine) ermöglichen eine Identifikation von Zellen, auch wenn diese ihre typische Lokalisation verlassen haben oder phänotypischen Veränderungen unterlagen. Denn selbst wenn die Zellen im Rahmen von Proliferations- oder Reifungsprozessen ihre spezifischen morphologischen Eigenschaften verlieren oder modifizieren, behalten sie zumeist ihre zelltyp-assoziierten Proteine bei [Hiscott, 2000]. Vorzugsweise Gliazellen und Zellen des retinalen Pigmentepithels besitzen eine erhebliche phänotypische Plastizität, sie können Fibrozyten-ähnliche oder auch Makrophagen-ähnliche Erscheinungen annehmen [Zhu, 1988; Machemer, 1978b]. Gliazellen zeichnen sich durch das Glial fibrillary acidic protein (GFAP) als IF-Protein aus, während RPE Zellen durch den Nachweis von Zytokeratin identifiziert werden können [Vinores, 1992; Foos, 1974]. Durch immunhistochemische Untersuchungen wurden GFAP-positive Gliazellen in den inneren Retinaschichten nachgewiesen, insbesondere in der Nervenfasern- und Ganglion-Zellschicht sowie in der Umgebung von Blutgefäßen. GFAP-positive Zellen konnten außerdem auch in der inneren und äußeren Grenzmembran und in Rissen der ILM gefunden werden [Hiscott, 2000]. Nicht immer gelingt eine eindeutige Zuordnung der zelltyp-spezifischen Proteine zu der jeweiligen Zellgruppe. Vinores et al. fanden durch immunzytochemische Simultanfärbungen heraus [Vinores, 1992], dass in epiretinalem Gewebe eine geringe Anzahl von Gliazellen und RPE Zellen sowohl positiv auf GFAP-Antigene als auch auf Zytokeratin-Antigene reagiert. Auch wenn die meisten Zellen nur positiv auf einen der beiden Zellmarker getestet werden können, wurden in einem von 10 Fällen idiopathischer ERM sowohl Zytokeratin-positive als auch GFAP-positive Zellen gefunden [Vinores, 1992; Campochiaro, 1992]. Darüber hinaus belegen ‚in vitro‘ Studien, in denen RPE Zellen, Gliazellen und Fibrozyten bezüglich ihrer morphologischen Eigenschaften und ihrer Expression von IF-Proteinen, Vimentin und Glutaminsynthetase untersucht wurden, dass diese Zellen nicht nur einem morphologischen Wandel, sondern insbesondere auch Veränderungen struktureller IF-Proteine und metabolischer Enzyme unterliegen. Kultivierte Gliazellen sind durchaus in der Lage, ebenfalls Zytokeratine zu exprimieren, während in RPE Zellen auch GFAP nachgewiesen werden kann [Vinores, 1990b].

1.2.5.2 Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren

Ein größtenteils unbekannter Cocktail von Wachstumsfaktoren spielt in der Regulierung von Chemotaxis, Proliferation, Kontraktion und EZM Produktion eine entscheidende Rolle. Schon seit einigen Jahren ist die Aufmerksamkeit u.a. auf folgende Faktoren gerichtet worden: fibroblast growth factor 5 (FGF-5) [Schneeberger, 1997], vascular endothelial growth factor (VEGF) [Schneeberger, 1997], platelet derived growth factor (PDGF) [Chen, 1997], connective tissue growth factor (CTGF) [Meyer, 2002] und transforming growth factor (TGF) [Meyer, 2002]. Sowohl der Wachstumsfaktor FGF als auch VEGF sollen nicht nur in

vaskulären sondern auch in avaskulären epiretinalen Membranen zu finden sein [Schneeberger, 1997]. Auch der PDGF und seine Rezeptoren werden in vaskulären und avaskulären ERM gefunden und treten mit ähnlicher Häufigkeit wie der VEGF auf. Sie werden u.a. von Endothelzellen und RPE Zellen synthetisiert [Campochiaro, 1994; Chen, 1997]. PDGF und VEGF sind insbesondere als autokrine und parakrine Stimulatoren von großer Bedeutung für die Entwicklung ERM [Chen, 1997]. Der Faktor CTGF ist erst vor kurzem durch Igarashi et al. identifiziert worden [Igarashi, 1993]. Neben CTGF ist ein zweiter Wachstumsfaktor, der TGF-beta, im Granulationsgewebe gefunden worden. Beide spielen eine wichtige Rolle bei der Synthese EZM Proteine. Dabei ist die Aufgabe von TGF-beta, die Produktion von CTGF mRNA zu initiieren [Igarashi, 1993]. Untersuchungen demonstrierten außerdem, dass durch das Auftreten von CTGF und TGF-beta die Expression von Kollagen Typ I und Fibronectin mRNA in Fibroblasten erhöht wird [Frazier, 1996]. Meyer et al. untersuchten daraufhin transformierte RPE Zellen und fibroblasten-ähnliche Zellen in epiretinalen Membranen [Meyer, 2002]. Ihre Ergebnisse zeigen, dass beide Zelltypen in der Lage sind, CTGF mRNA zu exprimieren. Darüberhinaus wurde eine kaskadenartigen Expression von CTGF mRNA, Kollagen Typ I und Tenascin nach TGF-beta Synthese bestätigt. Sie vermuten, dass TGF-beta die Entstehung epiretinaler Membranen in proliferativen Netzhauterkrankungen induziert, während CTGF zur Kontinuität der Entwicklung epiretinalen Gewebes beiträgt.

1.2.5.3 Extrazelluläre Proteine und ihre Bedeutung für die Pathogenese

Eng verbunden mit den Vorgängen zellulärer Proliferationen ist die Synthese und Verteilung extrazellulärer Glykoproteine, die als Verbindungsglied zwischen Zellen und EZM fungieren und auch in ERM eine Schlüsselrolle in der Pathogenese einnehmen. Fibronectin (FN) gehört neben Laminin und Vitronectin zu den bedeutendsten dieser Proteine und funktioniert als Mediator von Zell-zu-Zell- und Zell-zu-Matrix-Adhäsionen sowie als Auslöser von Migrationsvorgängen [Weller, 1991; Tsukamoto, 1981]. Obwohl gezeigt wurde, dass Fibronectin (FN) von unterschiedlichen Zellarten wie Fibroblasten, Makrophagen, retinalen Pigmentepithel-, Epithel- und Gliazellen als auch von Fibroblasten- und Makrophagen-ähnlichen Zellen synthetisiert werden kann, ist die definitive Quelle dieses Glykoproteins in ERM nicht eindeutig geklärt [Hiscott, 1985; Hiscott, 1993a]. Hiscott et al. konnten eruieren [Hiscott, 1993a], dass das FN epiretinaler Membranen in Patienten mit PDR einerseits in unlöslicher Form von zellulären Bestandteilen der Membranen selbst und andererseits in löslicher Form aus dem Plasma stammt. FN kann die Ansiedelung von RPE Zellen auf Plastikoberflächen verdoppeln und das adhäsive Verhalten von Fibroblasten um ungefähr 40% steigern [Grierson, 1996]. FN der extrazellulären Matrix tritt in 80% bis 100% zusammen mit Aktin, einem zytoplasmatischen Mikrofilament, auf. Aktin bildet einen intrazellulären, kontraktilen Proteinkomplex, der in zelluläre Vorgänge wie Migration,

Adhäsion und Phagozytose eingebunden ist. Die transmembranäre Beziehung zwischen diesen Mikrofilamenten und FN lässt vermuten, dass adhäsive Glykoproteine kontraktile Prozesse in ERM beeinflussen können. Während Laminin selektiv an Kollagen Typ IV bindet und deshalb auch nur in Basalmembranen gefunden wird, konnte Vitronektin in ERM von Patienten mit PVR gemeinsam mit FN lokalisiert werden [Weller, 1991]. Die große Affinität von FN zu unterschiedlichen Kollagenarten, insbesondere Typ II, Hyaluronsäure und Proteoglykanen, erlaubt eine variable Präsenz dieses Glykoproteins in zahlreichen Geweben [Kohno, 1987]. Aufgrund ihres Bindungsverhaltens sind sie für das Anhaften der Glaskörperhülle an die ILM sowie der ILM an die Müller Zellen von großer Wichtigkeit. Bedeutsam sind die Glykoproteine auch für die Entstehung ERM. In diesem Zusammenhang konnte nachgewiesen werden, dass FN durch aktivierte Makrophagen sezerniert wird und als Chemokin die Einwanderung von Fibroblasten ins Bindegewebe steuert [Tsukamoto, 1981].

Anti-proliferative Proteine, auch matrizelluläre Proteine genannt, sind die Gegenspieler oben beschriebener Glykoproteine und ermöglichen u.a. die Zellablösung. Auf diese Weise erleichtern sie Zellproliferation und Migration [Bornstein, 1995]. In ERM sind bereits Tenascin, Thrombospondin und Osteonektin beschrieben worden [Meyer, 2002; Hiscott, 2002]. Thrombospondin 1 (TSP-1), das die Zellproliferation und Migration erleichtert, bindet über Integrin-Rezeptoren und CD36 einerseits an Zellen, andererseits an Wachstumsfaktoren wie PDGF oder TGF. Außerdem hemmt es FGF und VEGF und erklärt damit teilweise die anti-angiogenen Eigenschaften von TSP1 [Lawler, 2000]. Im Zusammenhang mit epiretinalen Proliferationen ist bekannt, dass RPE Zellen TSP-1 bis TSP-4 synthetisieren [Carron, 2000]. TSP-1 wird ein bedeutender Einfluss auf die Migrationsfähigkeit von RPE Zellen zugeschrieben [Sheridan, 2001]. Osteonektin, auch SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine) genannt, ist ein stark wirksames, anti-adhäsives, matrizelluläres Protein, das besonders in schnell proliferierendem Gewebe eine Abrundung der Zellen hervorruft. Dies gilt allgemein als Index schwacher interzellulärer Adhäsionskräfte [Murphy-Ullrich, 2001]. Untersuchungen von Hiscott et al. Ergaben [Hiscott, 1999], dass einige der SPARC-enthaltenden Zellen in PVR Membranen vom RPE abstammen, was die Vermutung nahe legt, RPE Zellen könnten dieses Protein im Sinne einer autokrinen Funktionsschleife während der Entstehung ERM synthetisieren. In der Tat belegen in vitro Studien, dass RPE Zellen in der Lage sind, SPARC Gene zu exprimieren [Magee, 2000]. Anti-adhäsive Eigenschaften, wie das von SPARC induzierte Abrunden der RPE Zellen mit konsekutiver Zellablösung von der Bruch'schen Membran, werden als mögliche Ursachen für die Entdifferenzierung der RPE Zellen im Rahmen der Entstehung epiretinaler Proliferationen angesehen [Hiscott, 2002].

1.2.6 Konzepte zur Pathogenese – Die Suche nach den Schlüsselfaktoren

Die im Laufe der Jahre zur Diskussion gestellten Konzepte zur Pathogenese epiretinaler Membranen sind widersprüchlich. Einerseits existieren Hinweise für einen vitrealen Ursprung ERM, da durch eine unvollständige hintere Glaskörperablösung Zellen an der Netzhaut verbleiben können, die möglicherweise die Bildung epiretinaler Proliferationen initiieren [Jaffe, 1967; Hikichi, 1995]. Andererseits sprechen Defekte in der ILM für einen retinalen Ursprung, da diese eine Migration von Zellen an die vitreoretinale Grenzfläche erlauben und somit ebenfalls zur Bildung ERM führen können [Roth, 1971; Bellhorn, 1975; Wise, 1975a; Wise, 1975b]. Weitere Unklarheiten äußern sich z.B. in Überlegungen zur Bedeutung von Entzündungsvorgängen [Hiscott, 1988; Gilbert, 1988], in Erklärungsansätzen für Kontraktionsprozesse [Grierson, 1987], in der Suche nach dem Ursprung makrophagen- und fibroblasten-ähnlicher Zellen [Kampik, 1981a; Machemer, 1978b] oder in Untersuchungen zu komplexen Abhängigkeiten zwischen zellulären Komponenten und extrazellulärer Bestandteile epiretinalen Gewebes [Meyer, 2002; Hiscott, 2002; Hiscott, 1985; Hiscott, 1993a].

1.2.6.1 Gliose und Fibrose

Für die Bildung einfacher ERM, häufig als ‚Gliose‘ bezeichnet, wurde ursprünglich angenommen, dass ein primäres Ereignis die oberflächlichen Schichten der Retina inklusive innerer Grenzmembran schädigt, dass die retinalen Gliazellen daraufhin proliferieren, um dann durch lokale, wenn auch minimale Defekte der ILM auf die innere Seite der Netzhautoberfläche zu wandern [Foos, 1974; Roth, 1971]. Experimentelle Studien von Hiscott et al. konnten jedoch demonstrieren [Hiscott, 1988], dass nach Entzündungsreizen die ersten Zellproliferationen an der Papille sowie innerhalb der Retina auftreten und die ILM zu dieser Zeit zwar durch Vorwölbungen deformiert, aber noch intakt ist. Diese Vorwölbungen entstehen durch hervorstoßende Zellfortsätze von Gliazellen, welche im Verlauf die ILM durchbrechen. Weiterhin wird der elektronenmikroskopische Nachweis von Glaskörperresten an der Netzhaut oder die Dokumentation von nativen, vitrealen Kollagenfibrillen (8 nm bis 15 nm) in epiretinalem Gewebe auf die Bedeutung einer hinteren Glaskörperablösung für die Pathogenese ERM gewertet [Gandorfer, 2002; Heilskov, 1996; Hikichi, 1995]. Neben Tierversuchen, die einen Zusammenhang zwischen der Bildung ERM und Entzündungsvorgängen bestätigen, spricht auch das Vorliegen von Makrophagen und Lymphozyten für eine wesentliche Bedeutung inflammatorischer Prozesse [Hiscott, 1988; Gilbert, 1988; Charteris, 1992; Charteris, 1993]. Seit einigen Jahren werden Anstrengungen unternommen, um das Zusammenspiel von Entzündungsmediatoren zu entwirren. Bisherige Ergebnisse zeigen, dass Zytokine wie TNF- α , IL-1 und IL-6 sowie Wachstumsfaktoren [Schneeberger, 1997; Chen, 1997; Meyer, 2002] und extrazelluläre Glykoproteine [Meyer, 2002; Hiscott, 2002] in diese Vorgänge verwickelt sind.

Fibröse Veränderungen wandeln die primär gliösen Zellschichten einfacher ERM in komplexe Strukturen um. Der als ‚Fibrose‘ umschriebene Reparatursprozess, in Form einwandernder RPE Zellen, Fibrozyten oder fibroblasten-ähnlicher Zellen, wird im Vergleich zur ‚Gliose‘ durch Kollagenproduktion und Kontraktionspotenz charakterisiert [Kampik, 1981b]. Die Verteilung GFAP-positiver Zellen, die oft in einzelnen Schichten direkt der Retina anliegen, zeigt, dass Gliazellen einfacher ERM als Gerüst dienen könnten für eine sekundäre Migration und Proliferation von RPE Zellen und Fibroblasten. Immunhistochemische Studien haben des Weiteren herausgestellt, dass die gliösen Komponenten epiretinaler Proliferationen über Defekte der ILM kontinuierlich in die Gliazellarchitektur der Netzhaut übergehen, so dass für Gliazellen eine Funktion als Anker zwischen ERM und Retina denkbar ist. Es wird vermutet, dass über diese Verankerungen die tangentialen Traktionskräfte kontrahierender ERM auf die Netzhaut übertragen werden, was zu retinalen Falten und zur Zerstörung retinaler Schichtung führt [Hiscott, 1984]. Ungeklärt, ist die Frage nach der Herkunft der Fibroblasten in epiretinalem Gewebe, da sich für immunhistochemische Untersuchungen die Schwierigkeit ergab, über keinen spezifischen Nachweis für diese Zellart zu verfügen. Grierson et al. nehmen an [Grierson, 1996], dass fibroblastische Zellen aus der Glaskörperinnenseite oder dem perivaskulären Gewebe stammen. Von Zellen des retinalen Pigmentepithels wird behauptet, dass sie in Abhängigkeit ihres jeweiligen Umfeldes nur eine Fibroblasten-ähnliche Gestalt annehmen, denn sie bewahren trotz phänotypischen Veränderungen ihre epithelialen Eigenschaften und bleiben Keratin-positiv. Ferner ist denkbar, dass Fibroblasten von Hyalozyten abstammen, obwohl diese eher für makrophagen-ähnliche Charakteristika bekannt sind [Kampik, 1981; Grabner, 1980].

1.2.6.2 Adhäsion und Migration

Wachstumsfaktoren, Zytokine und Glykoproteine bestimmen die Adhäsionsfähigkeit aller zellulären Komponenten ERM. FN beispielsweise wirkt chemotaktisch auf RPE Zellen sowie auf retinale Glia und Fibroblasten. Indem FN die RPE Zellen in ihrem adhäsiven Potential und Fibroblasten in ihrem Migrationsverhalten beeinflusst und zum Ort des Geschehens zieht, trägt es entscheidend zur Entstehung komplexer ERM bei [Grierson, 1996].

1.2.6.3 Proliferation und Kontraktion

Der Vorgang der Kontraktion basiert vorrangig auf zellulären Aktivitäten und erklärt, warum einfache epiretinale Membranen weitaus weniger zur Kontraktion neigen als komplexe [Grierson, 1996]. Die Kontraktion ERM entsteht als Konsequenz von isolierten Migrationsvorgängen. Das heißt: Zellen üben während der Migration durch Zell-Matrix-Adhäsionen Traktionskräfte auf die darunter liegenden Substratschichten aus. Ausschlaggebende Faktoren sind in diesem Zusammenhang die Zellbewegung entlang einer Gerüstsubstanz, die Adhäsion zu dieser sowie die Verformbarkeit der darunter liegenden

Substratschichten [Grierson, 1996]. Harris et al. stellten diesen Mechanismus anschaulich dar [Harris, 1980; Harris, 1981], indem sie die Oberfläche eines Silikonöl-Tropfens, der auf einer Glasdeckplatte aufbracht war, mittels Bunsen-Brenner polymerisierten. Auf der dünnen Haut dieses Tropfens siedelten sie Zellen an. Makrophagen wanderten über das Silikonöl, ohne dabei Spuren zu hinterlassen. Fibroblasten hingegen verursachten tiefe Rillen. Grierson et al. bestätigten diese Ergebnisse durch Untersuchungen an RPE Zellen, retinaler Glia und okulären Fibroblasten [Grierson, 1996]. Die Bewegungen der Gliazellen auf Silikonöl hinterließen keine erkennbaren Spuren. RPE Zellen und Fibroblasten breiteten sich jedoch schon innerhalb der ersten Stunde nach Absiedelung auf der Oberfläche aus. Die entstehenden seitlichen Falten gingen von jeder einzelnen Zelle aus. Z.T. war die Kontraktionskraft auf die polymerisierte Silikonoberfläche so stark, dass Zerreißen auftraten und das darunter befindliche Öl austrat. Weitere Untersuchungen ergaben, dass durch die Migration der Zellen die kollagene Matrix verändert und zu Kollagenbündeln umorganisiert wird [Harris, 1981.] Vergleiche zwischen Myofibroblasten und Fibroblasten zeigten, dass primär Fibroblasten an der Entwicklung von Kontraktionen beteiligt sind und dass sie die dominierende Komponente in frühen Stadien epiretinaler Membranen darstellen, während Myofibroblasten zu einem späteren Zeitpunkt auftreten [Ehrlich, 1988]. Diesen kommt dann eine Bedeutung als Stabilisatoren zu, indem sie kontrahiertes Gewebe durch isometrische Kräfte in der jeweiligen Form halten, bis genügend Kollagen synthetisiert wurde, um das Narbengewebe zu stabilisieren [Grierson, 1988].

1.3 Gewebeaufbereitung für die Elektronenmikroskopie

Das vornehmliche Ziel der Materialaufbereitung für die Elektronenmikroskopie ist der Erhalt der Ultrastruktur. Für immunzytochemische Untersuchungen tritt ein weiterer wichtiger Aspekt zu dieser ersten Zielsetzung hinzu: der Erhalt antigener Strukturen. Für bestmögliche Ergebnisse erfordern beide Anliegen jedoch unterschiedliche Vorgehensweisen in der Gewebeaufbereitung. Die folgende Abbildung gewährt einen Überblick über die zur Verfügung stehenden Techniken der Gewebeaufbereitung.

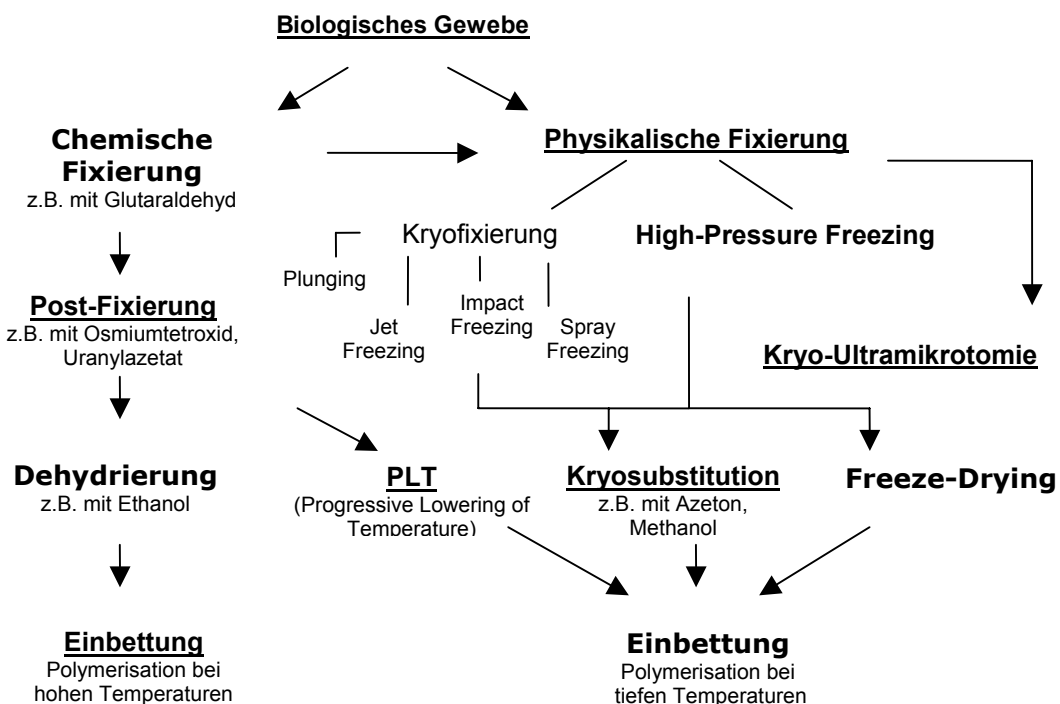


Abb. 1.1: Schematische Darstellung chemischer und physikalischer Präparationsverfahren. Das Gewebe durchläuft, abgesehen von der Methode der Kryo-Ultramikrotomie, drei Stufen der Aufbereitung: die Fixierung, die Entwässerung und die Einbettung mit Polymerisation des Einbettmediums bei hohen bzw. tiefen Temperaturen.

1.3.1 Konventionelle Präparationsverfahren der Elektronenmikroskopie

1.3.1.1 Die chemische Fixierung

Ein geeignetes Fixierungsmedium besteht einerseits aus einem fixierenden Agens und andererseits aus einer sogenannten Transportsubstanz, gewöhnlich einer Pufferlösung mit abgestimmtem Elektrolytgehalt. In jedem Fall erfordert eine Fixierung die exakte Anpassung von pH-Wert, Osmolalität und Ionenzusammensetzung des Mediums an die ursprünglichen, biologischen Bedingungen des Gewebes. Die heute am häufigsten verwendeten Fixierungsmedien enthalten Phosphat- oder Cacodylat-Puffer sowie Natriumchlorid oder Glukose bzw. Saccharose als ionische oder nicht-ionische Zusätze [Glauert, 1975]. Der Einsatz von Phosphat-Puffern hat den Vorteil, dass er Ähnlichkeiten zu extrazellulären

Komponenten aufweist und nicht toxisch wirkt. Nachteilig ist, dass sich im Vergleich zu anderen Puffersystemen während der Fixierung schneller Präzipitate bilden und dass sich während des Aufbewahrens Mikroorganismen ansiedeln können.

In der Licht- und Elektronenmikroskopie (EM) stellte Osmiumtetroxid (OsO_4) lange Zeit die Basis für die Herstellung von Fixierungsmedien dar [Palade, 1952]. Erst im Jahr 1963 änderte sich das Prozedere, als von Sabatini et al. eine doppelte Fixierung aus Glutaraldehyd (GA) und OsO_4 vorgeschlagen wurde [Sabatini, 1963]. Die Kombination aus GA und OsO_4 gewährleistet eine hervorragende ultrastrukturelle Erhaltung des Gewebes stellt seither ein Standardverfahren für morphologische Untersuchungen in der EM dar. Die hervorragenden ultrastrukturellen Ergebnisse einer Glutaraldehyd-Fixierung basieren hauptsächlich auf der Reaktivität, als bipolares Aldehyd stabile Verbindungen mit Proteinen einzugehen [Hayat, 1970]. Lipide werden durch eine GA-Fixierung nicht erfasst und bleiben nur schlecht erhalten. Aufgrund dessen können bei alleiniger GA-Fixierung ungefähr 95% des Lipidgehaltes während nachfolgender Fixierungs- und Dehydrierungsvorgänge extrahiert werden [Stein, 1971]. Deshalb spielt im Anschluss an eine Aldehyd-Fixierung der Gebrauch von OsO_4 als sekundärer Stabilisator eine wesentliche Rolle. OsO_4 reagiert mit Gewebekomponenten, die durch GA nicht fixiert wurden. Es trägt jedoch nicht nur zum Erhalt der Gewebestrukturen sondern auch wesentlich zu deren Destruktion bei. Neben der Bindung an lipidhaltige Strukturen reagiert OsO_4 mit Protein-, Nukleinsäure- und Kohlenhydratkomponenten und zerstört nahezu jegliche antigene Reaktivität von biologischem Material. Die Reaktivität des OsO_4 führt zu Veränderungen im Aufbau der Zellmembran mit konsekutiv veränderter, freier Permeabilität für Ionen und Proteine. Auch können vorher membrangebundene Proteine aus der Zellmembran herausgelöst werden und ungehindert ins Fixierungsmedium diffundieren. Derartig zerstörte Zellmembranen sind z.T. nicht in der Lage, die osmotischen Eigenschaften der Zelle aufrecht zu erhalten; die Zelle kann anschwellen und platzen [Tormey, 1965, Millonig 1968].

Formaldehyd (FA) ist dem GA ähnlich. Es diffundiert jedoch im Vergleich zu GA schneller ins Gewebe, wodurch die Strukturen vor ihrer Fixierung weniger Veränderungen unterliegen. Andererseits reagiert es langsamer mit den Gewebestrukturen, die dadurch nur mit Verzögerung und zudem auch nur reversibel fixiert werden. Die Testung unterschiedlicher Aldehyde und die Herstellung Methanol-freien Formaldehyds aus Paraformaldehyd (pFA) führte dazu, dass Karnowski im Jahr 1965 für eine Mischung aus pFA und GA demonstrieren konnte [Karnowski, 1965], dass eine Kombination beider Aldehyde die Gewebestrukturen besser fixiert als jedes einzelne für sich. Dabei ergänzt pFA die Wirkung des GA durch ein schnelleres Eindringen ins Gewebe sowie durch eine unterschiedliche Affinität. PFA reagiert als monopolarer Molekül weitaus weniger mit Proteinen als GA, besitzt andererseits aber die

Fähigkeit, Lipide zu fixieren [Hayat, 1970]. Obwohl pFA schneller das Präparat durchdringt, verlaufen die Reaktionen von pFA langsamer und z.T. reversibel, so dass vor einem anschließenden Auswaschen von pFA gewarnt werden muss. Auch können Präparate aufgrund der reversiblen Wirkungsweise nicht in pFA aufbewahrt und gelagert werden, wie es für die primäre GA-Fixierung für längere Zeit möglich ist.

1.3.1.2 Die Dehydrierung

Die meisten Einbettungsmedien sind unlöslich in Wasser. Aus diesem Grund müssen fixierte Präparate schrittweise dehydriert werden, bevor sie von Einbettungsmedien wie Harz oder Kunststoff infiltriert werden können. Ethanol, Methanol und Azeton stellen die am häufigsten verwendeten Substitutionsmedien dar. Bei konventionellen Präparationsverfahren wird Ethanol oft der Vorzug gegeben, denn Azeton besitzt die Eigenschaft, leicht Wasser aufzunehmen, was u.U. zu einer unvollständigen Dehydrierung führt. Die Extraktion von Lipiden wird durch die Verwendung von Azeton als dehydrierendes Agens jedoch eingeschränkt. Deshalb bewährt sich Azeton im Entwässerungsprozedere von lipid-reichem Gewebe [Johnston, 1967]. Die Extraktion von Lipiden und Proteinen bleibt das zentrale Problem in der Zerstörung der Gewebsstrukturen durch den Prozess der Dehydrierung. Die Zellen schrumpfen durch Permeabilitätsstörungen, die Zellorganellen verlieren ihre ursprüngliche Gestalt. Strukturelle Veränderungen während der Dehydrierung stellen aber nur einen geringen Teil derer dar, die während des Fixierungsvorgangs entstehen können. Verglichen mit den Auswirkungen der Fixierung auf den Strukturhalt des Gewebes, stellt die Wahl des entsprechenden Entwässerungsprotokolls einen unwesentlicheren Schritt in der Planung des Präparationsablaufs dar. Dennoch ist es sinnvoll, die Präparate so schnell wie möglich bzw. nur so lange wie nötig dem Dehydrierungsmedium auszusetzen. Ein Entwässerungsvorgang bei tiefen Temperaturen ist empfehlenswert, um dem Lipidverlust und somit der Gewebeerstörung entgegenzuwirken [Stein, 1971]. Ein standardisiertes, konventionelles Dehydrierungsprotokoll sieht vor, das Präparat durch eine aufsteigende Serie von Ethanol oder Azeton zu führen, beginnend mit 50%iger und endend mit absoluter Dehydrierungslösung.

1.3.1.3 Einbettung und Polymerisation

Der letzte Schritt in der Gewebsaufbereitung für die Elektronenmikroskopie besteht darin, die Präparate nach vorangegangener Dehydrierung mit flüssigem Einbettmedium zu infiltrieren und anschließend zu einem Block zu polymerisieren. Aufgrund ihrer hervorragenden Eigenschaften sind die Epoxy-Harze die am häufigsten genutzten Einbettmedien. Ihre Polymerisation verläuft gleichmäßig und ist nur mit geringen Volumenschwankungen von bis zu 2% verbunden. Epoxy-Harze sind sie unter dem Elektronenstrahl stabil. Ein wesentlicher Nachteil besteht in ihrer hohen Viskosität, welche eine vergleichsweise längere

Infiltrationszeit notwendig macht [Glauert, 1975]. Chemisch betrachtet sind Epoxy-Harze Polyarylether mit glyzerol-tragenden, terminalen Epoxy-Gruppen. Ihre Polymerisation wird durch Zusatzsubstanzen, gewöhnlich aliphatische Polyamine oder aromatische Anhydride, ausgelöst, die dem Harz zur Quervernetzung und zur dreidimensionalen Struktur verhelfen. Das Aushärten der Epoxy-Harze entspricht demnach einer zusätzlichen Reaktion, die unabhängig von einem weiteren Initiator abläuft und die Gleichmäßigkeit der Polymerisierung bedingt. Die größten Unterschiede zwischen den Epoxy-Harzen bestehen in ihrer Viskosität. Epon 812 ist beispielsweise eines der niedrig viskösen Harze und ein weltweit verbreitetes Standard-Einbettmedium. Die Eigenschaften der Polyester-Harze sind ähnlich wie die der Epoxy-Harze. Einige ihrer Bestandteile sind jedoch nicht stabil, so dass u.a. Probleme bei der Aufbewahrung die Verwendung der Polyester-Harze einschränken. Polyester-Harze sind unlöslich in Ethanol, was eine Entwässerung in Styrol oder Azeton notwendig macht [Glauert, 1975]. Die Polymerisation der Methacrylate verläuft nur ungleichmäßig und ist mit Volumenschwankungen von bis zu 15% bis 20% verbunden, die das Gewebe erheblich verändern können. Kleinste Unreinheiten oder das Gewebe selbst können die Polymerisierung initiieren, die demzufolge an mehreren Stellen im Präparat gleichzeitig und ungeordnet beginnt. Unter dem Elektronenstrahl verhalten sich die Methacrylate weniger stabil als die Epoxy-Harze. Aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit sind sie jedoch für die Einbettverfahren immunzytochemischer Studien besonders geeignet. Methacrylat-Einbettmedien bestehen i.d.R. aus einem Gemisch unterschiedlicher Methacrylate und Katalysatoren wie z.B. Butyl- und Methylmethacrylate, Benzoylperoxid und Benzoin- bzw. Uranylinitrat. Sie sind klare, flüchtige Flüssigkeiten mit niedriger Viskosität und spezifischem Geruch. Sie lassen sich leicht mit Ethanol oder Azeton mischen und bleiben selbst bei tiefen Temperaturen noch flüssig.

Um für immunzytochemische Studien sowohl die immunologische Sensitivität als auch die Feinstruktur des Gewebes zu erhalten, ist eine Einbettung bei tiefen Temperaturen mit Acrylaten erforderlich. Epoxide sind nicht zu empfehlen, da sie kovalent an zelluläre Komponenten binden, hydrophob sind und bei +50°C bis +60°C polymerisiert werden müssen. Acrylate hingegen sind hydrophile Einbettmedien, die auf einer Temperaturskala von -70°C bis +65°C eine Polymerisierung mittels UV-Licht, Katalysatoren oder Wärme ermöglichen [Hobot, 1989].

1.3.2 Die Kryomethoden

Für immunzytochemische Untersuchungen an Ultradünnschnitten sind Präparationsverfahren verbreitet, die initial eine milde chemische Fixierung erfordern wie die Kryo-Ultramikrotomie und die Methode des „Progressive Lowering of Temperature“ (PLT).

Andererseits stellt die Kombination aus Kryofixierung, Gefriersubstitution und Einbettung des Gewebes bei niedrigen Temperaturen eine Alternative zur chemischen Fixierung dar. Die Kryo-Ultramikrotomie wurde von Tokuyasu entwickelt [Tokuyasu, 1973]. Sie beginnt mit der Fixierung des biologischen Materials in Aldehydlösungen. Danach folgt eine Kryoprotektion sowie eine Kryofixierung. Von dem tiefgefrorenen Präparat werden Ultradünnschnitte angefertigt, sogenannte Cryo-Schnitte, welche dann für immunologische Nachweisverfahren verwendet werden können. Durch Umgehen von Dehydrierungs- und Einbettungsschritten ist die Antigenität des Gewebes gut erhalten. Mit dieser Methode lassen sich jedoch kaum Schnitte von weniger als 100 nm anfertigen, so dass Details der Ultrastruktur nur begrenzt definierbar sind. Die PLT-Methode, die eine schrittweise Reduktion der Temperatur während des Dehydrierungsprozesses darstellt, wurde durch Carlemalm et al. eingeführt [Carlemalm, 1982]. Vorfixierte Gewebeproben werden in aufsteigenden Alkoholreihen entwässert. Verbunden mit dem Vorgang der Dehydrierung ist eine gleichmäßige Temperaturabnahme. Bei einem Tiefpunkt von z.B. -35°C wird das Gewebe von hydrophilen Methacrylaten infiltriert und anschließend polymerisiert. Durch das Arbeiten bei tiefen Temperaturen werden Denaturierungs- und Diffusionsvorgänge vermindert. Die Kombination aus Kryofixierung, Gefriersubstitution und Tieftemperatureinbettung umgeht die denaturierenden Effekte der konventionellen Präparationstechniken, wobei der Kryofixierung hinsichtlich der Stabilisierung zellulärer und extrazellulärer Komponenten eine zentrale Bedeutung zukommt [Humbel, 1983; Hunziker, 1984]. Ein weiterer Vorteil der Kryofixierung besteht im sofortigen Anhalten dynamischer, zellulärer Prozesse. Da erst nach der Kryofixierung das Gewebe von chemischen Lösungen penetriert wird und die Substitution bei tiefen Temperaturen abläuft, können deletäre Reaktionen durch Chemikalien minimiert werden. Die nach der Infiltration mit Einbettmedium einsetzende Polymerisation fixiert anschließend das biologische Material noch bevor eine Erwärmung des Präparates auf Raumtemperatur die Reaktivität zwischen Gewebe und Einbettmedium wieder steigert.

1.3.2.1 Kryofixierung

Extrazelluläre Eiskristallbildung kann den osmotischen Druck ändern und zur Austrocknung der Zellen führen. Intrazelluläre Eiskristalle können die Zellorganellen zerstören und ein Platzen der Zellen bewirken [Elder, 1989]. Ziel der Kryofixierung muss sein, durch extrem schnelles Gefrieren das Wasser des biologischen Materials in einen vitrealen Zustand zu überführen, der dann als „vitreal“ bezeichnet wird, wenn auf elektronenmikroskopischer Ebene keine Kristalle sichtbar sind [Dubochet, 1988]. Durch den Prozess der Vitrifikation wird im Idealfall das Stadium der Eiskristallbildung übersprungen und das Wasser in eine glasige, amorphe Masse umgewandelt, die keine störenden Effekte auf das Gewebe ausübt. Für die Kryofixierung sind derzeit folgende Methoden verbreitet: ‚Plunging‘, ‚Slamming‘, ‚Jet Freezing‘, ‚Spraying‘ und ‚High-Pressure Freezing‘.

Fernández-Moran führte als erster das ‚Plunging‘ ein [Fernández-Moran, 1960], das Eintauchen des biologischen Gewebes in flüssiges Heliums bei -271°C . Abgewandelt mittels kommerziell erhältlicher Apparate oder als manuelle Anwendung mit flüssigem Stickstoff ist das ‚Plunging‘ bei Präparaten von weniger als 1 mm Dicke eine der am häufigsten genutzten Methoden. Van Harreveld et al. modifizierten diese Technik [van Harreveld, 1964]. Sie ließen das Präparat auf einen durch flüssigen Stickstoff vorgekühlten Silberblock mit polierter Oberfläche bei -207°C aufprallen. Diese Methode wird ‚Slamming‘, ‚Slam Freezing‘, ‚Impact Freezing‘ oder ‚Metall Mirror Freezing‘ genannt und fixiert nur die obersten, leicht zugänglichen Schichten des Gewebes homogen bis zu einer Tiefe von ca. 5 μm bis 15 μm . Mit dem Abstand zur Oberfläche des Präparates nimmt die Eiskristallbildung zu. Häufig finden beim ‚Slam Freezing‘ mit flüssigem Stickstoff vorgekühlte Kupferblöcke Verwendung. Müller et al. fixierten kleinere Präparate durch ‚Jet Freezing‘ mit flüssigem Propan [Müller, 1980]. Diese Methode lässt sich als eine Variante des ‚Plunging‘ beschreiben. Es besteht jedoch der Unterschied, dass beim ‚Jet Freezing‘ das Kryogen mit großer Geschwindigkeit auf ein stationäres Präparat gespritzt wird, welches sich zwischen zwei Metallblättern oder Metallfolien befindet. Bachmann et al. entwickelten eine Technik für Zellsuspensionen, Mikroorganismen oder Makromoleküle [Bachmann, 1971], die als ‚Spray Freezing‘ bezeichnet wird. Dabei werden Zellen, verteilt in Mikrotropfen, in flüssiges Propan oder Ethan gesprüht. Diese Methode beschränkt sich jedoch auf Mikroorganismen oder einzelne Zellen. Das Prinzip der ‚High-Pressure‘ Kryofixierung beruht darauf, dass das Gewebe in einer Überdruck-Kühlanlage bei ca. 2100 bar fixiert wird, so dass der Gefrierpunkt von Wasser sinkt. Damit wird auch das Risiko der Entstehung von Eiskristallformationen reduziert. Das Wasser wird durch den Überdruck beim Übergang vom flüssigen in den festen Zustand an seiner Expansion gehindert. Auf diese Weise können bis zu 500 μm tiefe Gewebeschichten gleichmäßig und ohne die Ausbildung von Eiskristallen vitrifiziert werden [Quintana, 1994]. Unklar ist jedoch, welche Veränderungen der Ultrastruktur durch die hohen Druckapplikationen ausgelöst werden können [Wilson, 1998; Quintana, 1994].

Flüssigkeiten wie Propan, Ethan, Isopentan, Helium, Freon oder Stickstoff und Metalle wie Aluminium, reines Kupfer, Silber oder Gold sind als Kryogene ausgetestet worden [van Harreveld, 1964; Fernández-Moran, 1960]. Neben der Wärmeleitfähigkeit des Kryogens hat auch die Wärmekapazität des Präparates einen entscheidenden Einfluss auf den Grad der Vitrifikation. Eine Verbesserung der Fixierung ist durch die Volumenreduktion des Präparates zur Senkung der Wärmekapazität, durch die Wahl eines Kryogens mit hoher Wärmeleitfähigkeit oder durch die Änderung physikalischer Eigenschaften des Wassers möglich. Dafür bedient man sich der Vorbehandlung mit Kryoprotektoren oder des Einsatzes von Überdruck. Beide Anwendungen führen zu einer Senkung des Gefrierpunktes von

Wasser, bergen aber die Gefahr, ultrastrukturelle Veränderungen zu bewirken [Humbel, 1983].

Kryoprotektive Substanzen werden nach ihrer Gewebeporosität in penetrierende und nicht-penetrierende Substanzen eingeteilt. Zur ersten Gruppe zählen z.B. Glycerol, Dimethylsulfoxid und Ethylenglykol, zur zweiten Gruppe zählen hochmolekulare Stoffe wie Polyvinylpyrrolidin, Hydroxyethylstärke, Saccharose, Albumin oder Dextran. Der Zusatz von Kryoprotektoren verändert die Anordnung der Wassermoleküle im Zytoplasma. Deshalb muss ein Kompromiss zwischen dem konzentrationsabhängigen Gefrierschutz und dem Grad der strukturellen Schädigung gefunden werden. Die am häufigsten benutzte Substanz ist die Saccharose, deren hochkonzentrierter Gebrauch im Zusammenhang mit der Kryo-Ultramikrotomie und immunzytochemischen Untersuchungen durch Tokuyasu eingeführt wurde [Tokuyasu, 1973]. Obwohl Saccharose morphologische Veränderungen und einen Ionenverlust bewirken kann, ist die Methode in der Erhaltung Fixierungs-sensitiver Antigene erfolgreich.

1.3.2.2 Gefriersubstitution

Kryofixierte Präparate können durch Gefriertrocknung im Vakuum oder durch Gefriersubstitution mittels organischer Lösungsmittel mit oder ohne chemischen Fixanzien entwässert werden [Quintana, 1994]. Bei der Gefriertrocknung wird das gefrorene Wasser durch Sublimation entfernt. Diese Methode der Dehydrierung im Vakuum eignet sich für biologische Mikroanalysen da die Diffusion von kleiner Moleküle eingeschränkt wird. Bei diesem Verfahren treten jedoch Volumenänderungen von mehr als 20% auf, die zu Schrumpfungs-, Fältelungs- und Aggregationsartefakten führen. Die Gefriersubstitution wird aufgrund leichter Reproduzierbarkeit und Erhalts morphologischer Strukturen für immunzytochemische oder ultrastrukturelle Untersuchungen empfohlen. Das gefrorene Wasser kann ohne wesentliche Volumenänderungen durch das Substitutionsmedium ersetzt werden. Die Gefriersubstitution ist keine Neuentwicklung der vergangenen Jahre. Sie war bereits Bestandteil des von Fernández-Morà 1960 angewandten Kryopräparationsverfahrens für ultrastrukturelle Untersuchungen [Fernandez, 1960]. Er schlug als einer der ersten eine Kombination aus Gefriersubstitution und Tieftemperatureinbettung vor, um den Erhalt des Gewebes zu verbessern. Allerdings scheiterte zu dieser Zeit die Kälteinfiltration aufgrund des Fehlens geeigneter Einbettmedien. Die damals erhältlichen Methacrylate erwiesen sich als ungeeignet, da sie sich unter dem Elektronenstrahl nicht stabil verhielten.

1.3.2.3 Einbettung und Polymerisation

Mit der Einführung der Acrylate als Alternative zu den Epoxy-Harzen standen erstmals elektronenstrahlstabile Kunststoffe für die Einbettung bei tiefen Temperaturen zur Verfügung.

Derzeit kann eine Vielzahl von Medien für die Tieftemperatureinbettung verwendet werden, die sich jedoch in Polarität, Viskosität und Polymerisationsverhalten voneinander unterscheiden. Anfang der 80iger Jahre wurden zunächst die Lowicryls durch Carlemalm et al. eingeführt [Carlemalm, 1982]. Die erste Serie der Lowicryl Kunststoffe beinhaltete das polare K4M und das unpolare HM20 Lowicryl, bestehend aus einem Gemisch von Acrylaten und Methacrylat-Estern mit Thioethylenglykol-Dimethacrylat-Stabilisatoren. Weitere Lowicryls folgten in Form des polaren K11M und des unpolaren HM23. Die Anwendung der Lowicryls beschränkt sich nicht auf tiefe Temperaturen, sondern erlaubt eine Infiltration und Polymerisation zwischen -70 und $+20^{\circ}\text{C}$ durch UV-Licht oder chemische Katalysatoren [Hobot, 1989]. Ende der 80iger Jahre folgten weitere hydrophile Acrylate: das LR White [Newman, 1989] und das LR Gold [Migheli, 1992]. Durch die Einbettung bei tiefen Temperaturen sowie durch eine freie Permeabilität für wässrige Lösungen verbessern auch sie die Nachweisbarkeit antigener Strukturen. Wie die Lowicryls soll auch die Anwendung von LR Gold und LR White zum Verlust morphologischer Details führen. LR Gold scheint dem LR White im Erhalt von Zellmembranen und lipidreichen Elementen jedoch überlegen zu sein [Migheli, 1992]. Das neueste unter den Acrylaten ist das Unicryl, welches durch Scala et al. unter dem Namen Bioacryl eingeführt wurde [Scala, 1992]. Unicryl erlaubt eine universelle Handhabung in der Licht- und Elektronenmikroskopie. Unicryl soll z.B. im Erhalt der Ultrastruktur oder im Färbeverhalten bei immunhisto- und immunzytochemischen Untersuchungen anderen Acrylate überlegen sein [Goping, 1996].

Die Polymerisation der Acrylate, eine exotherm verlaufende Reaktion, erfolgt häufig durch die indirekte Bestrahlung mit UV-Licht. Um eine Gasblasenbildung innerhalb des Einbettmediums oder innerhalb des Gewebes während der Polymerisation zu verhindern, müssen die Temperaturwahl sowie die Lokalisation der Lichtquelle überdacht werden. Denn je niedriger die Temperatur und je größer die Entfernung der Lichtquelle zu den Präparaten, desto geringer die Exothermie und damit die Gefahr ungleichmäßig polymerisierten Kunststoffs. Ein umgekehrter Zusammenhang besteht jedoch zur zeitlichen Dauer der Polymerisation, so dass bei einem Routineverfahren immer Aufwand und Nutzen im Verhältnis stehen sollten.

2. MATERIAL UND METHODEN

Einem Kollektiv von fünfzehn Patienten mit epiretinaler Gliose wurde im Verlauf einer Pars-plana-Vitrektomie epiretinales Gewebe entnommen. Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Operation zwischen 38 und 82 Jahren alt und fühlten sich durch Visusreduktion und Metamorphopsien beeinträchtigt. Das während der Vitrektomie gewonnene und sofort verarbeitete Untersuchungsmaterial wurde auf drei Versuchsreihen zu je acht Präparaten aufgeteilt.

2.1 Der Präparationsablauf

Die **Präparate V 1 – V 8** wurden mit jeweils einem Tropfen 40%iger Saccharose-Lösung und 1-Hexadecene vorbehandelt und ohne Zusatz chemischer Fixanzien kryofixiert. Die Präparate V 1 bis V 4 sind in flüssigem Stickstoff (LN₂) durch ‚Impact Freezing‘, auch Metallspiegel-Kryofixierung genannt, fixiert worden. Die Präparate V 5 bis V 8 sind durch ‚Plunging‘ fixiert worden. Anschließend wurden alle acht Präparate bei –92°C für 48 Stunden mit Azeton substituiert und bei +4°C mit G-Medium infiltriert und eingebettet.

Die **Präparate VI 1 – VI 8** wurden in gleicher Weise wie die der Gruppe V kryofixiert und substituiert. Jedoch sind die Präparate der Gruppe VI mit Unicryl infiltriert und eingebettet worden.

Die **Präparate VII 1 – VII 8** wurden in Anlehnung an die standardisierte chemische Fixierung in einer Lösung aus 2% Paraformaldehyd (pFA) und 0,05% Glutaraldehyd (GA) mit 0,1 M Phosphatpuffer nach Sörensen bei pH 7,4 und +4°C über Nacht fixiert. Danach wurden sie ebenfalls bei +4°C in einer aufsteigenden Azetonreihe dehydriert und in Unicryl oder G-Medium eingebettet.

Alle Präparate der Gruppen V, VI und VII wurden mittels indirektem UV-Licht bei +4°C über einen Zeitraum von 8-14 Tagen polymerisiert.

Präp. - Nr.	IC-Nr. des Patienten	Pat. Alter in Jahren	Pat. M/W	Fixierung	Dehydrierung/ Substitution	Einbettung
V 1	IC 0005	72	W	Cryo – slam freezing	Gefriersubstitution	G-Medium
V 2	IC 0006	55	W	Cryo – slam freezing	Gefriersubstitution	G-Medium
V 3	IC 0006	55	W	Cryo – slam freezing	Gefriersubstitution	G-Medium
V 4	IC 0006	55	W	Cryo – slam freezing	Gefriersubstitution	G-Medium
V 5	IC 0012	63	W	Cryo – plunging	Gefriersubstitution	G-Medium
V 6	IC 0013	67	W	Cryo – plunging	Gefriersubstitution	G-Medium
V 7	IC 0013	67	W	Cryo – plunging	Gefriersubstitution	G-Medium
V 8	IC 0013	67	W	Cryo – plunging	Gefriersubstitution	G-Medium
VI 1	IC 0006	55	W	Cryo – slam freezing	Gefriersubstitution	Unicryl
VI 2	IC 0007	38	M	Cryo – slam freezing	Gefriersubstitution	Unicryl
VI 3	IC 0007	38	M	Cryo – slam freezing	Gefriersubstitution	Unicryl
VI 4	IC 0008	67	W	Cryo – slam freezing	Gefriersubstitution	Unicryl
VI 5	IC 0008	67	W	Cryo – plunging	Gefriersubstitution	Unicryl
VI 6	IC 0009	72	W	Cryo – plunging	Gefriersubstitution	Unicryl
VI 7	IC 0011	65	W	Cryo – plunging	Gefriersubstitution	Unicryl
VI 8	IC 0011	65	W	Cryo – plunging	Gefriersubstitution	Unicryl
VII 1	IC 0010	66	W	2 % pFA / 0,05 % GA	Dehydrierung	Unicryl
VII 2	IC 0018	82	W	2 % pFA / 0,05 % GA	Dehydrierung	Unicryl
VII 3	IC 0019	61	M	2 % pFA / 0,05 % GA	Dehydrierung	Unicryl
VII 4	IC 0016	69	M	2 % pFA / 0,05 % GA	Dehydrierung	Unicryl
VII 5	IC 0015	70	W	2 % pFA / 0,05 % GA	Dehydrierung	G-Medium
VII 6	IC 0020	63	W	2 % pFA / 0,05 % GA	Dehydrierung	G-Medium
VII 7	IC 0017	65	M	2 % pFA / 0,05 % GA	Dehydrierung	G-Medium
VII 8	IC 0020	63	W	2 % pFA / 0,05 % GA	Dehydrierung	G-Medium

Abb. 2.1: Aufteilung der epiretinalen Membranen in die Präparategruppen V, VI und VII.

2.1.1 Die Fixierung

2.1.1.1 Die Kryofixierung

Die Größe, Transparenz und Adhäsionsneigung des epiretinalen Gewebes machte zur Lokalisation einiger kleiner Gewebestücke eine der Kryofixierung vorausgehende Anfärbung mit Toluidinblau notwendig, die jedoch im Verlauf durch Substitutionsmedium wieder herausgewaschen wurde. Große Gewebestücke sind noch vor der Fixierung zerteilt worden. Gefärbtes sowie nicht gefärbtes Material wurde anschließend für das ‚Impact Freezing‘ und das ‚Plunging‘ in gleicher Weise vorbereitet. Dazu zählte die Zugabe je eines Tropfens 40%iger Saccharose-Lösung und 1-Hexadecene (bezogen von Sigma Geisenhofen) für jeweils eine Minute. Danach wurde das Gewebe auf ein ca. 0,5 cm x 1,0 cm großes,

feinporiges Filterpapierplättchen aufgebracht, das während der gesamten Präparation als Träger diente. Vorversuche hatten gezeigt, dass andere Trägersubstanzen wie Agar- oder Gelatineplättchen nicht geeignet waren. Agarplättchen führten beim Anfertigen der Ultradünnschnitte zur Instabilität der Präparateblöcke, so dass diese durch unkontrollierte Spaltbildung entlang des Trägers zerstört wurden, und Gelatineplättchen verhielten sich unstabil im Substitutionsmedium.

Die Präparate V 1 bis V 4 und VI 1 bis VI 4 wurden mittels ‚Impact Freezing‘ kryofixiert. Zu diesem Zweck wurde ein Metallspiegel-Kryofixationssystem, das Reichert MM80 E (Leica, Wien) benutzt. Das Gerät verfügt über einen 4-Liter-Dewarbehälter für LN₂, der mit einer Arbeitskammer in Verbindung steht. In der Mitte dieser Arbeitskammer befindet sich eine Halterungsvorrichtung für den austauschbaren, auf ca. –190°C vorgekühlten Kupferspiegel. Über dem mobilen Kupferspiegel ist ein beweglicher Kolben mit pneumatischer Dämpfung und Rücklauf Sperre installiert, an dessen unterem Ende das Präparat angebracht wird, welches dann bei Lösen des Kolbens mit variabler Aufprallgeschwindigkeit und einstellbarem Anpressdruck auf die hochpolierte Oberfläche des Metallspiegels trifft. Das MM 80E System gewährleistet laut Hersteller einen kontinuierlichen Kontakt des Präparates mit dem gekühlten Metallblock. Sobald eines der oben genannten acht Präparate zusammen mit Filterpapierplättchen an der Unterseite des Kolbens befestigt war, wurde der Kolben gelöst. Der Kontakt zum Kupferspiegel betrug jeweils eine Minute. Anschließend wurde der Kolben manuell zurückgezogen, das Filterpapier als Träger des epiretinalen Gewebes vom Kupferblock gelöst und noch innerhalb der von LN₂ gekühlten Arbeitskammer in FT(flow-through)-Kapseln eingebracht.

Die Präparate V 5 bis V 8 und VI 5 bis VI 8 wurden mittels ‚Plunging‘ kryofixiert, wofür ebenfalls das Kryofixationssystem MM 80E verwendet wurde. In diesem Fall war jedoch nur der Dewarbehälter von Bedeutung, der mit LN₂ gefüllt werden musste, bis sich in der gekühlten Arbeitskammer ein Flüssigkeitsspiegel gebildet hatte. Mit einer Pinzette wurden die Filterpapierplättchen mit den Präparaten für eine Minute in den flüssigen Stickstoff gehalten und danach ebenfalls in die FT-Kapseln eingelegt. Mit LN₂ gefüllte Transportbehälter gewährleisteten, dass sich die kryofixierten Proben beim Transport zum Kühlschrank nicht erwärmten. Die Präparate wurden bei –80°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.1.1.2 Die modifizierte chemische Fixierung

Die Präparate VII 1 bis VII 8 sind ohne ein vorheriges Anfärben mit Toluidinblau und ohne die Verwendung von Filterpapier als Trägersubstanz in einer Lösung aus 2% pFA und 0,05%

GA bei +4°C auf einem Rotationsschüttler für die Dauer von ca. 18 Stunden fixiert worden. Danach wurden die Präparate in drei Durchgängen mittels 0,1 M Phosphatpuffer bei pH 7,4 für zwei Stunden gewaschen. Für die Fixierungs- und Waschlösungen wurde ein 0,1 M Phosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 verwendet. Der Ansatz des Phosphat-Puffers stellt ein Gemisch aus Lösungen ein- und zweibasischer Phosphatsalze dar. Der Phosphat-Puffer ist zur Vermeidung von Niederschlägen vor jedem Gebrauch neu angesetzt worden:

(1)	0,2 M zweibasische Phosphatlösung	40,5 ml
(2)	0,2 M einbasische Phosphatlösung	9,5 ml
(3)	Auffüllen mit destilliertem Wasser bis	100,0 ml

Um das Risiko der Maskierung von Antigenen zu reduzieren, wurde kein Natriumazid (NaN_3) beigemischt, welches einen antibakteriellen Zusatzstoff in kommerziell erhältlichen Pufferlösungen darstellt.

Das Fixierungsmedium aus 2% pFA und 0,05% GA wurde vor Gebrauch aus folgenden Komponenten frisch angesetzt:

(1)	0,2 M Phosphat-Puffer mit pH 7,4	50,0 ml
(2)	10%ige Paraformaldehyd-Lösung	20,0 ml
(3)	25%ige Glutaraldehyd-Lösung	0,2 ml
(4)	Auffüllen mit destilliertem Wasser bis	100,0 ml

Das Glutaraldehyd wurde als 25%ige Stammlösung von Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen. Vor Gebrauch wurde die Lösung mittels 10%iger Aktivkohle durch Schütteln und Filtrieren gereinigt. In kommerziell erhältlichen Formaldehyd-Lösungen ist Methanol enthalten, das diese Lösungen für die Präparation in der Elektronenmikroskopie unbrauchbar macht. Deshalb muss bei Bedarf eine Methanol-freie Lösung aus Paraformaldehyd hergestellt werden. Für eine 10%ige pFA-Lösung wurden 2 g pFA in 20 ml destilliertem Wasser gelöst. Der Ansatz wurde auf 60-65 °C erwärmt. Einige Tropfen 1,0 N NaOH sind hinzugefügt worden bis die Lösung klar wurde. Vor Weiterverwendung ist die Lösung abgekühlt worden.

Während für GA-Fixierungen Waschgänge von bis zu 24 Stunden nötig sind, sollten pFA-fixierte Präparate aufgrund der Reversibilität von Vernetzungsreaktionen und Extraktion von Gewebekomponenten nur für kurze Zeit in der Waschlösung gelagert werden. Deshalb sind die mit 2% pFA und 0,05% GA fixierten Präparate der hier beschriebenen Untersuchungen

nur für zwei Stunden bei +4°C auf einem Rotationsschüttler gewaschen worden, bevor sie für die Dehydrierung weiterverwendet wurden.

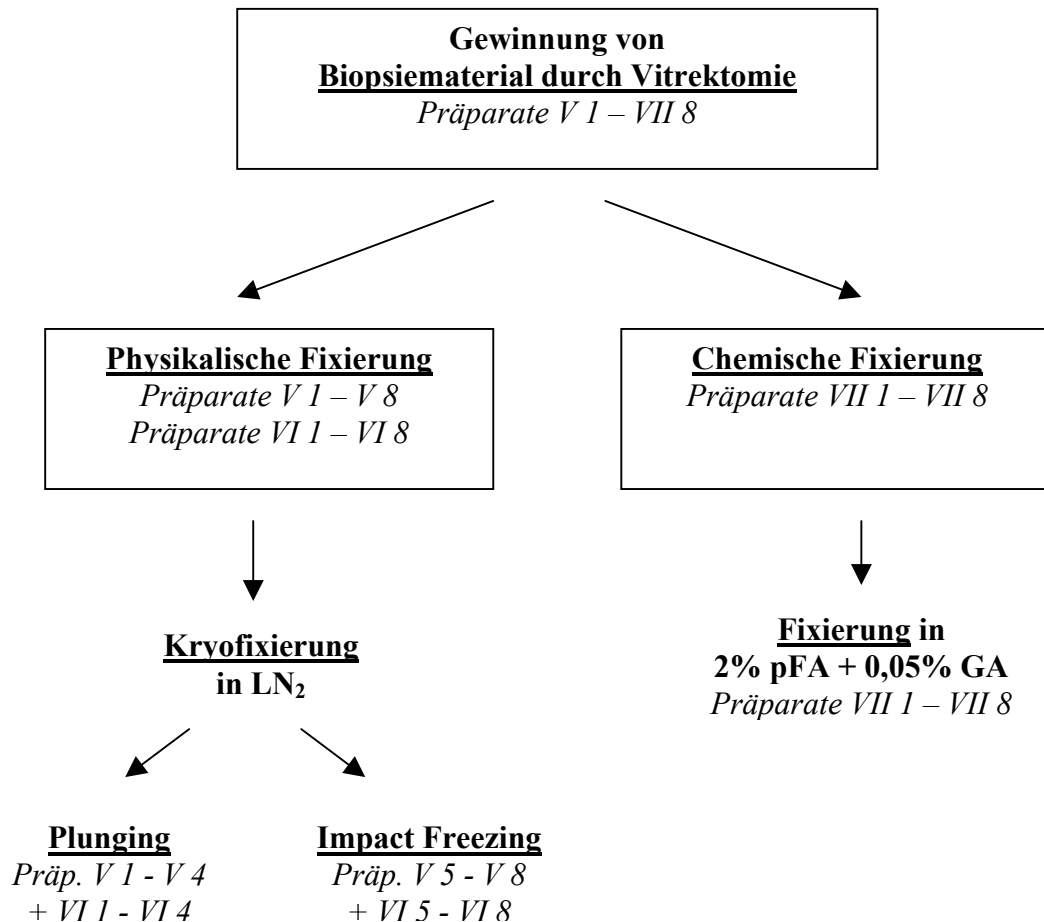


Abb. 2.2: Übersichtsdarstellung von chemischer Fixierung und Kryofixierung mit entsprechender Einteilung der Präparate.

2.1.2 Die Entwässerung

2.1.2.1 Die Gefriersubstitution

Nachdem die Präparate V 1 bis V 8 und VI 1 bis VI 8 kryofixiert und in FT-Kapseln eingebracht waren, wurden sie gleichzeitig der Gefriersubstitution zugeführt. Für diesen Arbeitsschritt als auch für die Infiltration und Einbettung wurde ein automatisches Gefriersubstitutionssystem benutzt, das Leica AFS (Leica, Wien). Das Gerät verfügt über einen Dewarbehälter, der durch sein LN₂-Fassungsvermögen von 30 Liter den Verlauf einer Gefriersubstitution oder einer Tieftemperatureinbettung über den Zeitraum von bis zu 10 Tagen gewährleistet. In der Arbeitskammer des Gerätes kann über einen vorwählbaren Zeitraum eine programmierbare Temperatur zwischen –150 °C und +65°C aufrecht erhalten

werden. Die für dieses Gerät entwickelten FT-Kapseln, die an ihrer Unterseite kleine Löcher aufweisen, werden in vorgekühlte Behälter gestellt. Die Löcher der FT-Kapseln sind schmal, so dass sie selbst von kleineren Gewebeteilen, die während der Substitution z.T. vom Filterpapier abschwimmen, nicht passiert werden können. Die Behälter der FT-Kapseln wurden mit ebenfalls vorgekühltem Substitutionsmedium gefüllt. Mit dem Senken und Heben des Flüssigkeitsspiegels im Behälter sank und stieg auch die Füllung der FT-Kapseln. Eventuelle Turbulenzen, die beim Austauschen des Substitutionsmediums oder bei Waschdurchgängen auftreten können, wurden dadurch minimiert. Alle sechszehn kryofixierten Präparate wurden in der Arbeitskammer der Leica AFS auf -92°C gekühlt und für 48 Stunden bei dieser Temperatur mit reinem Azeton infiltriert. Danach wurde das Substitutionsmedium erneuert und die Temperatur innerhalb von 24 Stunden um 4°C pro Stunde auf $+4^{\circ}\text{C}$ angehoben. Die Dauer der Entwässerung betrug demnach für 16 Präparate insgesamt 72 Stunden.

2.1.2.2 Die konventionelle Dehydrierung

Die chemisch fixierten Präparate VII 1 bis VII 8 wurden in einer Kühlanlage bei $+4^{\circ}\text{C}$ auf einem Rotationsschüttler dehydriert. Dafür wurde jede einzelne Membran durch eine aufsteigende Azetonreihe von 10-30-50-70-90- und 100% für jeweils zweimal 10 Minuten geführt. Die Dauer der Entwässerung betrug demnach für 8 Präparate insgesamt 16 Stunden. Während dieser Zeit musste das jeweilige Präparat alle zehn Minuten in eine neue Azetonlösung eingebracht werden.

2.1.3 Einbettung und Polymerisation

2.1.3.1 Die Infiltration kryofixierter Präparate

Die sechszehn kryofixierten Präparate sind im Anschluss an die Entwässerung im Leica AFS eingebettet worden. Die Substitutionslösung ist gegen ein Gemisch aus Einbettmedium und Azeton ausgetauscht worden. Die Präparate V 1 bis V 8 sind in G-Medium und die Präparate VI 1 bis VI 8 in Unicryl eingebettet worden. Mit Lösungen von Medium/Azeton im Verhältnis 1:2, 1:1 und 2:1 wurde je zweimal für 15 Minuten bei $+4^{\circ}\text{C}$ auf einem Rotationsschüttler infiltriert. Darauf folgte ein dreimaliges Auswechseln des 100%igen Einbettmediums nach jeweils 30 Minuten. Die FT-Kapseln mit den Präparaten wurden anschließend in Gelatine kapseln überführt, die bereits mit neuem Einbettmedium gefüllt waren und mittels spezieller Vorrichtungen luftdicht verschlossen wurden.

2.1.3.2 Die Infiltration chemisch fixierter Präparate

Die Infiltration der Präparate von Gruppe VII erfolgte analog zu der von Gruppe V und VI. Die Unterschiede bestanden darin, dass zur Aufrechterhaltung von $+4^{\circ}\text{C}$ kein Leica AFS-Gerät sondern eine herkömmliche Kühlanlage benutzt wurde, dass die chemisch fixierten

Membranen nicht auf Filterpapier aufgebracht waren und sich nicht in FT-Kapseln befanden, sondern dass sie ohne Trägersubstanz von Glasbehältern in Gelatinekapseln eingebracht wurden. Die Präparate VII 1 bis VII 4 sind in Unicryl und die Präparate VII 5 bis VII 8 in G-Medium eingebettet worden.

Alle 24 Präparate der Gruppen V, VI und VII sind durch indirektes UV-Licht bei +4°C polymerisiert worden. Die Gelatinekapseln befanden sich dazu in Propanol, das als Kühl- und Dispersionsmittel diente. Die Lichtquelle wurde unterhalb der Präparate in einem Abstand von ca. 30 cm installiert. Nach einem Zeitraum von ungefähr 14 Tagen war die Polymerisation abgeschlossen.

Das Einbettmedium Unicryl ist kommerziell erhältlich und wurde von BBInternational aus Cardiff bezogen. Unicryl kann unter Lichtabschluss bei +4 bis -20°C für 12 Monate gelagert werden. Polymerisiertes Unicryl ist inert. Das G-Medium verfügt über ähnliche Eigenschaften wie das Unicryl. Zu 100 ml G-Medium ist 1,3 g Benzoylperoxid als Initiator zugegeben worden. Es wurde vor jedem Gebrauch aus folgenden Komponenten neu angesetzt.:

(1)	2-Hydroxyethylmethacrylat	35	ml
(2)	2-Hydroxypropylmethacrylat	35	ml
(3)	n-Butylmethacrylat	24	ml
(4)	Styrol	6	ml

In Anlehnung an das von Scala et al. entwickelte Bioacryl sind in mehreren Vorversuchen verschiedene Verhältnisse der oben genannten Komponenten ausgetestet worden [Scala, 1992]. Ziel war, das Verhalten der Blöcke bei der Polymerisation sowie ihre Schneideigenschaften zu untersuchen und zu vergleichen. Das Medium G konnte ausgewählt werden, weil es vergleichbare Charakteristika wie kommerziell erhältliches Unicryl aufweist. Es besteht jedoch der Vorteil, dass die Eigenschaften des G-Mediums nach den Erfordernissen der Präparation durch Variation der Bestandteile bestimmt werden können.

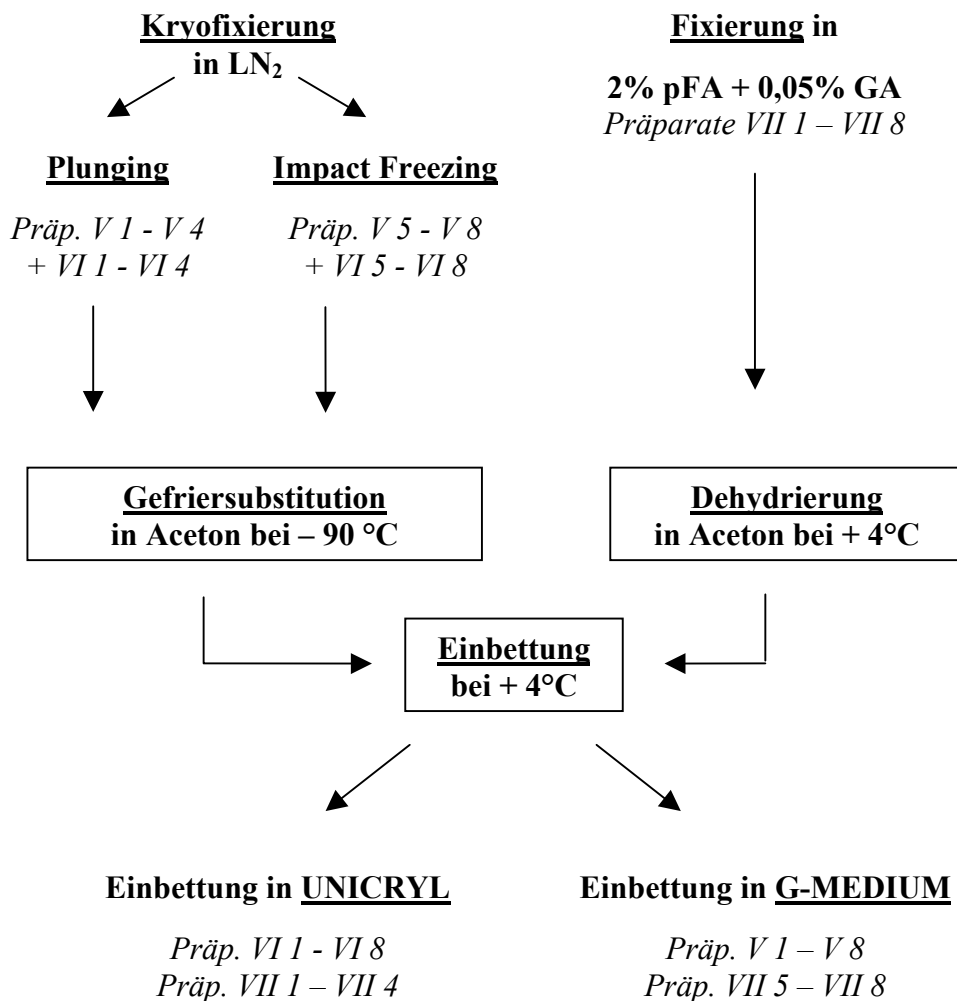


Abb. 2.3: Darstellung des Versuchsablaufs von Gefriersubstitution und chemischer Dehydrierung sowie Einbettung mit entsprechender Einteilung der Präparate.

2.1.4 Mikrotomie und Mikroskopie

2.1.4.1 Die Semidünnschnitte

Von allen 24 Präparaten wurden Semidünnschnitte von 500 nm Dicke angefertigt. Die Blöcke wurden getrimmt und am Ultramikrotom Leica Ultracut R (Leica, Wien) mit einem Glasmesser geschnitten. Anschließend sind die Schnitte auf einen Objektträger aufgebracht, mit Toluidinblau nach Richardson gefärbt und unter dem Photomikroskop II (Zeiss, Oberkochen) ausgewertet worden.

2.1.4.2 Die Ultradünnschnitte

Die Ultradünnschnitte von ca. 30 nm bis 50 nm wurden mit dem Leica Ultracut R angefertigt, wofür ein Diamantmesser verwendet worden ist. Die Schnitte sind in einem Wasserbad aufgefangen und von dort auf Metallnetze (Nickelgrids) aufgebracht worden. Anschließend wurden die Schnitte, auf den Grids liegend, mit Uranylazetat bei +60°C für 15 Minuten und mit Bleizitrat nach Reynolds bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert, um sie für die TEM zu kontrastieren. Für die Auswertung wurden mit dem Elektronenmikroskop EM 9S-2 (Zeiss, Oberkochen) Aufnahmen angefertigt.

Präp.Nr.	FIXIERUNG	ENTWÄSSERUNG	EINBETTUNG	POLYMERISATION
V 1-4	Saccharose 40%ig 1min, Hexadecene 1min, Impact Freezing	48 Std. bei -92°C in reinem Aceton , 1x Waschen in Substitutionsmedium, Temperaturerhöhung in 24 Std. um 4°C/Std. auf +4°C	G-Medium Infiltration: Medium/Aceton = 1:2, 1:1, 2:1, je 2x15min, 3x 100% Medium je 30min)	indirektes UV-Licht bei +4°C Abstand der Lichtquelle ca. 30cm , Polymerisation 8-14 Tage in Gelatine kapseln
V 5-8	Saccharose 40%ig 1min, Hexadecene, Plunging in LN2			
VI 1-4	Saccharose 40%ig 1min, Hexadecene 1min, Impact Freezing		Unicryl Infiltration: (Medium/Aceton = 1:2, 1:1, 2:1, je 2x15min, 3x 100% Medium je 30min)	
VI 5-8	Saccharose 40%ig 1min, Hexadecene, Plunging in LN2			
VII 1-4	15min Fixierung in 2% Paraformaldehyd und 0,05% Glutaraldehyd , 2 Std. Waschen in Phosphatpuffer	Dehydrierung bei +4°C in aufsteigender Acetonreihe : 10-30-50-70-90-100% je 2x10min,	Unicryl Infiltration: Aceton/Unicryl (2:1, 1:1, 1:2 je 2x15min, 3x30min in 100% Medium)	
VII 5-8			G-Medium Infiltration: Aceton/G-Medium (2:1, 1:1, 1:2 je 2x15min, 3x30min in 100% Medium)	

Abb. 2.4: Präparationsprotokoll der Gruppen V, VI und VII.

3. ERGEBNISSE

Von insgesamt 72 lichtmikroskopischen und ungefähr 350 elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden die nachfolgenden Abbildungen ausgewählt, um zwei wesentliche Aussagen zu belegen:

1. Die Abbildungen epiretinaler Membranen, die auf einem Träger aus feinporigem Filterpapier mittels ‚Impact Freezing‘ oder ‚Plunging‘ kryofixiert wurden, erlauben nur eine begrenzte Beurteilung morphologischer Strukturen sowohl auf elektronenmikroskopischer als auch auf lichtmikroskopischer Ebene.
2. Die licht- und elektronenmikroskopischen Abbildungen epiretinaler Membranen, die in einer Lösung aus 2% Paraformaldehyd und 0,05% Glutaraldehyd fixiert wurden, lassen eine zufriedenstellende Differenzierung morphologischer Details zu.

3.1 Beschreibung lichtmikroskopischer Aufnahmen

3.1.1 Die Präparate der Kryofixierung

3.1.1.1 Trägersubstanz und Dünnschnittqualität

Die **Abbildung a** zeigt, dass die Semidünnschnitte mittels ‚Plunging‘ kryofixierter epiretinaler Membranen zerrissen sind. Die Schnitte sind während des Semidünnschneidens an der Stelle zerstört worden, an der sich das eingebettete Filterpapier mit dem epiretinalen Gewebe befindet. Die Abbildung erlaubt, Membranreste von angeschnittenem Filterpapier zu unterscheiden. Sowohl Membranstrukturen als auch Filterpapier werden von verschiedenartigen Zwischenräumen unterbrochen. Runde, ausgestanzt wirkende Löcher sind vermutlich auf Eiskristallformationen zurückzuführen. Längliche, regelmäßige Spalten entsprechen den Poren des Filterpapiers. Die **Abbildung b** zeigt ein Nebeneinander von zerstörten und gut erhaltenen Gewebeanteilen im Semidünnschnitt einer durch ‚Plunging‘ kryofixierten ERM. Verwaschene und aufgetriebene Strukturen entsprechen dabei zerstörten Membrananteilen. Die gefalteten, tubulären Strukturen können erhaltenen Anteilen epiretinalen Gewebes zugeordnet werden.

3.1.1.2 Differenzierbarkeit epiretinalen Gewebes

Durch ‚Plunging‘ kryofixierte ERM erlauben die Differenzierung von retinaler und vitrealer Seite der ILM, wie der Semidünnschnitt der **Abbildung c** zeigt. Zellkerne oder Kernbestandteile sind nicht definierbar. Semidünnschnitte von epiretinalen Membranen, die durch ‚Impact Freezing‘ kryofixiert wurden, zeigten regelmäßig destruierte und komprimierte Strukturen epiretinalen Gewebes. Die **Abbildung d** demonstriert beispielhaft, dass ILM und Zellkerne nicht sicher abgrenzbar sind.

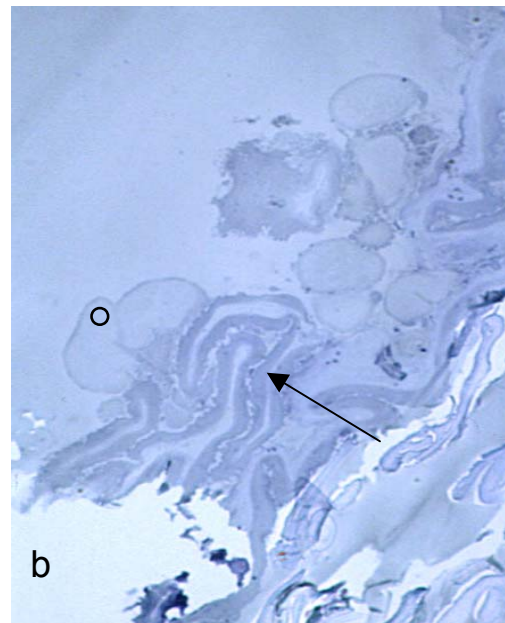
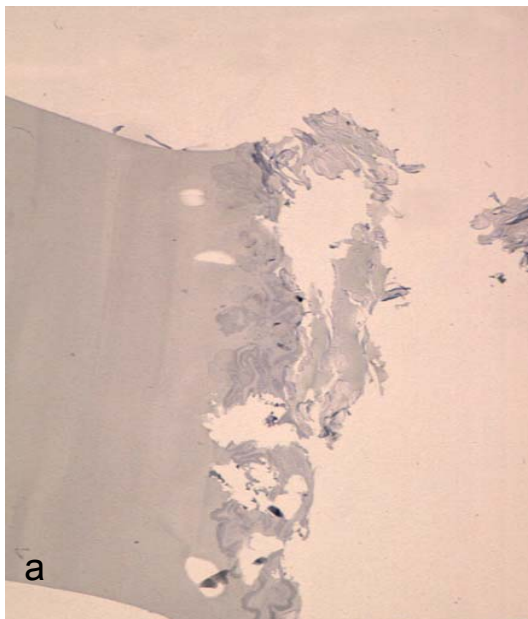


Abb. a - b: Semidünnschnitt einer durch ‚Plunging‘ kryofixierten ERM. Zerreißen des Schnitts am Übergang von epiretinalem Gewebe und Filterpapier. Nebeneinander von erhaltenen (Pfeil) und zerstörten Membranstrukturen (Kreis). Vergrößerung 50- und 190-fach.

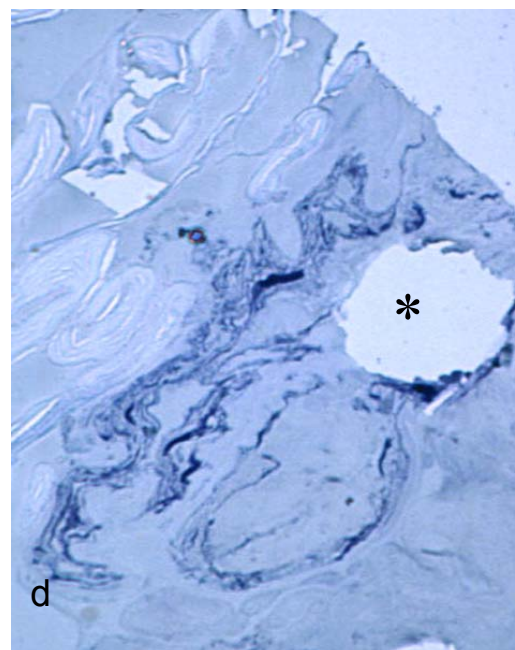
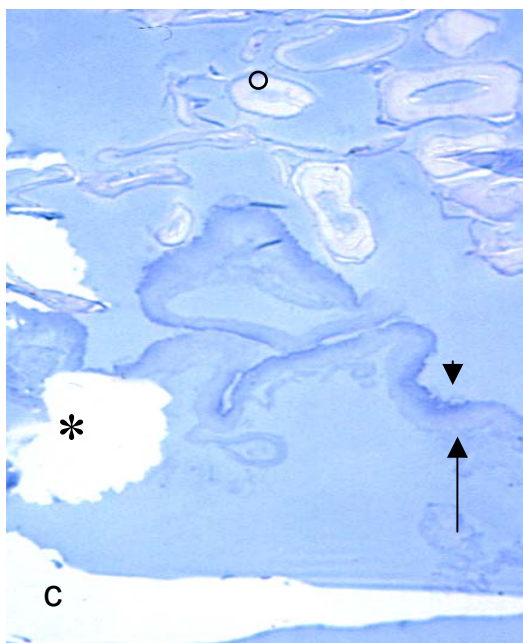


Abb. c: Semidünnschnitt einer durch ‚Plunging‘ kryofixierten ERM. Differenzierbarkeit von retinaler (Pfeilspitze) und vitrealer (Pfeil) Seite der ILM. Vergrößerung 190-fach.

Abb. d: Semidünnschnitt einer durch ‚Impact Freezing‘ kryofixierten ERM. Destruktion und Komprimierung des Gewebes. Keine ILM definierbar. Lochformation innerhalb der ERM (Stern). Vergrößerung 240-fach.

3.1.2 Die Präparate der chemischen Fixierung

3.1.2.1 Dünnschnittqualität und Schichtung epiretinalen Gewebes

Semidünnschnitte von epiretinalen Membranen, die in 2% pFA / 0,05% GA fixiert und ohne Trägersubstanz eingebettet wurden, weisen eine hohe Qualität auf. Es konnten keine Destruktionen der Schnitte beobachtet werden. Die Differenzierbarkeit zwischen retinaler und vitrealer Seite der ILM sowie der Kollagenschicht erlaubt eine sichere Orientierung in Semidünnschnitten chemisch fixierter ERM wie die **Abbildung e** demonstriert.

Die Schichtung epiretinaler Membranen ist definierbar (ILM - kollagene Matrix mit Zelleinlagerungen) und die ILM im Detail beurteilbar, wie **Abbildung f** zeigt. Es fällt die scharf begrenzte, stark kontrastierte, unregelmäßige retinale Seite und die unscharf begrenzte, verwaschene, weniger stark kontrastierte, glatte vitreale Seite der ILM auf.

3.1.2.2 Zelluläre Details chemisch fixierter, epiretinaler Membranen

Semidünnschnitte von epiretinalen Membranen, die chemisch mit 2%p FA / 0,05% GA fixiert wurden, weisen zelluläre Details auf. Dicht gepackt liegen die Zellen mit den deutlich gefärbten Zellkernen in der kollagenen Matrix (Stern) der **Abbildung g**. Eine stark gefaltete ILM (Pfeil) wirft sich entlang der zellreichen Kollagenschicht auf.

In der kollagenen Matrix chemisch fixierter, epiretinaler Membranen lassen sich eindeutig Zellkerne identifizieren, auch Nukleoli und Kernmembran dieser Zellkerne sind sicher erkennbar, wie die **Abbildung h** demonstriert.

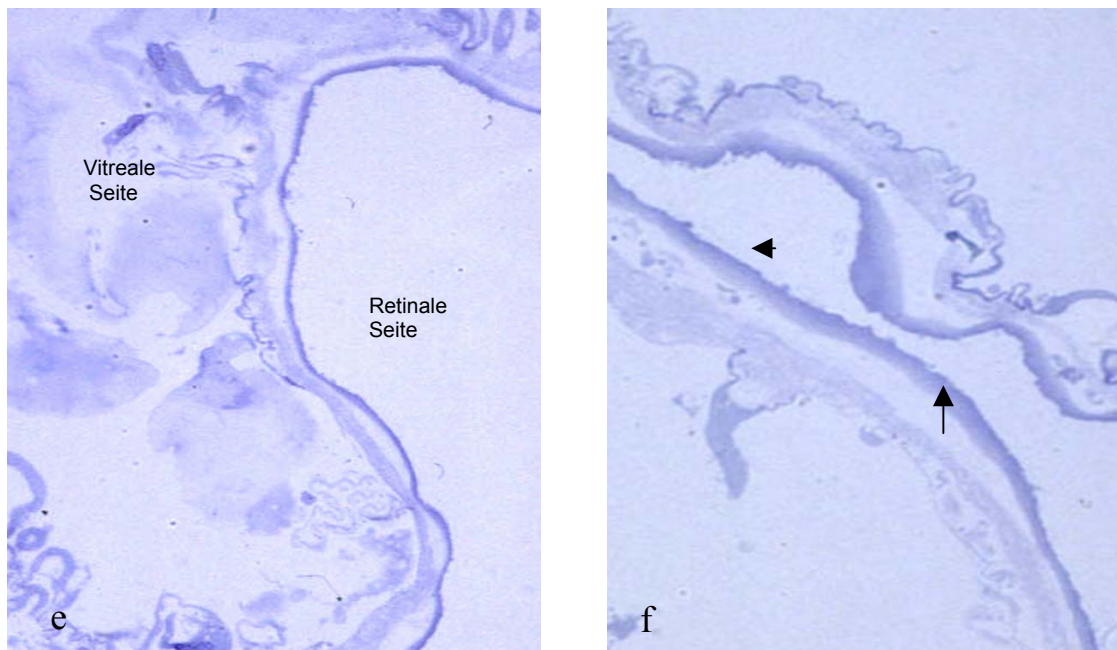


Abb. e - f: Semidünnschnitte chemisch fixierter ERM in 2% pFA / 0,05% GA. Schichtung des Gewebes und Differenzierung von retinaler (Pfeilspitze) und vitrealer Seite der ILM (Pfeil). Keine Destruktionen des Schnittes. Vergrößerung 120- und 240-fach.

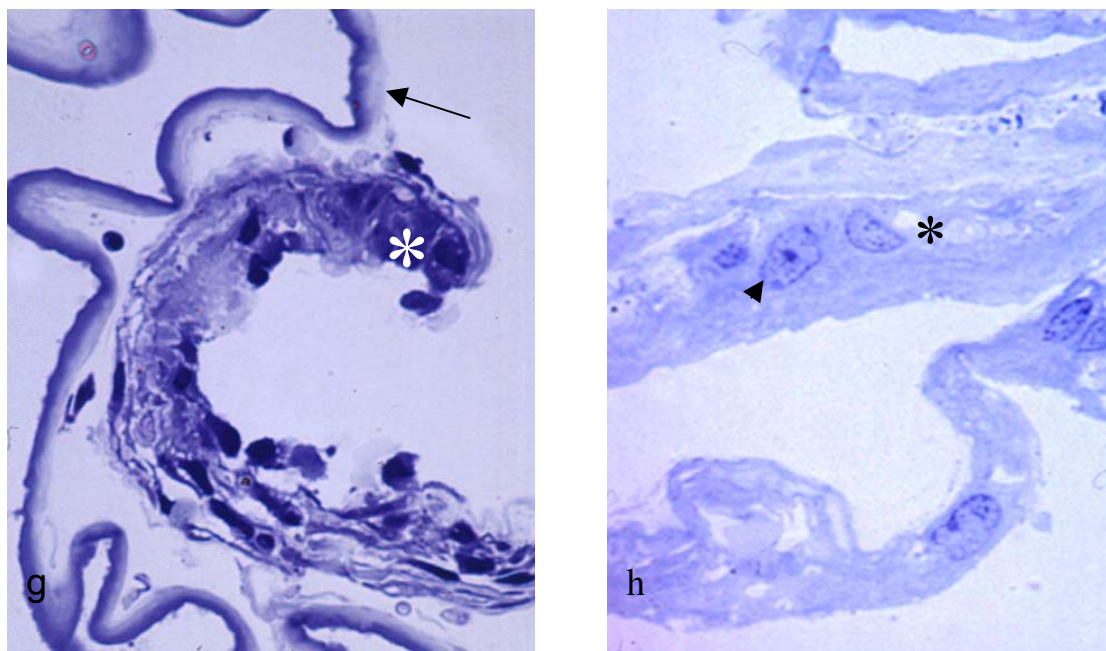


Abb. g - h: Semidünnschnitte chemisch fixierter ERM in 2% pFA / 0,05% GA. Stark gefaltete Membranen. Zellkerne mit Nukleoli (Pfeilspitze) eingebettet in extrazellulärer Matrix (Stern) auf der vitrealen Seite der ILM (Pfeil). Vergrößerung 190- und 240-fach.

3.2 Beschreibung elektronenmikroskopischer Aufnahmen

3.2.1 Die Präparate der Kryofixierung

3.2.1.1 Differenzierbarkeit der Membrankomponenten

Die Ultradünnschnitte von kryofixierten epiretinalen Membranen erlauben die Orientierung im Gewebe und die Differenzierung einzelner Membranbestandteile wie ILM, extrazelluläre Matrix mit Kollagenfibrillen und Zelleinlagerungen.

Die **Abbildung A** zeigt den Ausschnitt einer ILM, die sich als homogene Schicht von der ihr anliegenden Kollagenschicht abgrenzt. Die zellulären Reste, die rechts oben im Bild A zu erkennen sind, lassen keine eindeutige Identifikation oder detaillierte Beschreibung zellulärer Strukturen zu. In keiner Abbildung des kryofixierten Gewebes sind definierbare Strukturen zellulärer Bestandteile epiretinaler Membranen gefunden worden.

Während die retinale Seite der ILM unregelmäßig aufgebrochen ist, zeigt sich die vitreale Seite glatt begrenzt. Wie die **Abbildung B** demonstriert, ist die ILM am Übergang zur Kollagenschicht glatt und an der gegenüberliegenden Seite unduliert. Indem zwischen einer retinalen, unregelmäßigen und einer vitrealen, glatten Seite der ILM unterschieden werden kann, erlaubt die Struktur der ILM auch bei kryofixierten epiretinalen Membranen eine eindeutige Orientierung am Schnitt..

Auffällig ist die ausgeprägte und gleichmäßige, retikuläre Musterung der ILM, die in **Abbildung C** deutlich zu erkennen ist.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen: Präp. V 1 – V 8 und VI 1 – VI 8

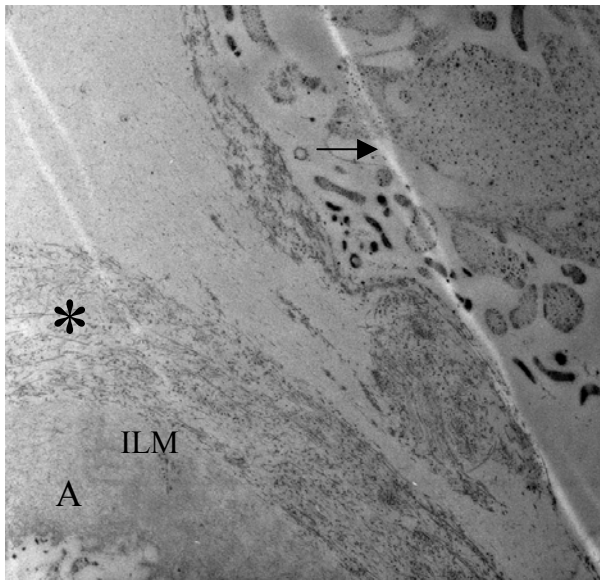


Abb. A - C:
 Ultradünnschnitte von
 epiretinalen Membranen nach
 Kryofixierung durch ‚Plunging‘.

Abb. A:
 Differenzierbarkeit von ILM,
 kollagener Matrix (Stern) und
 Zellresten (Pfeil).
 Vergrößerung 9,600-fach

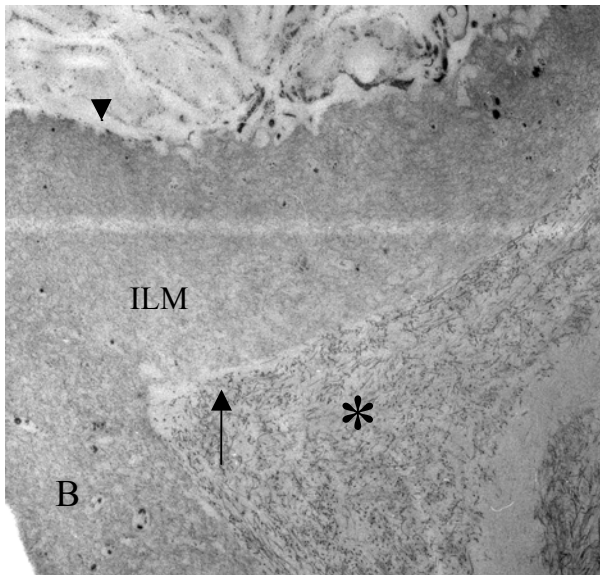


Abb. B:
 Retinale (Pfeilspitze) und vitreale
 Seite (Pfeil) der ILM sind
 identifizierbar. Kollagene Matrix
 abgrenzbar (Stern).
 Vergrößerung 5,500-fach

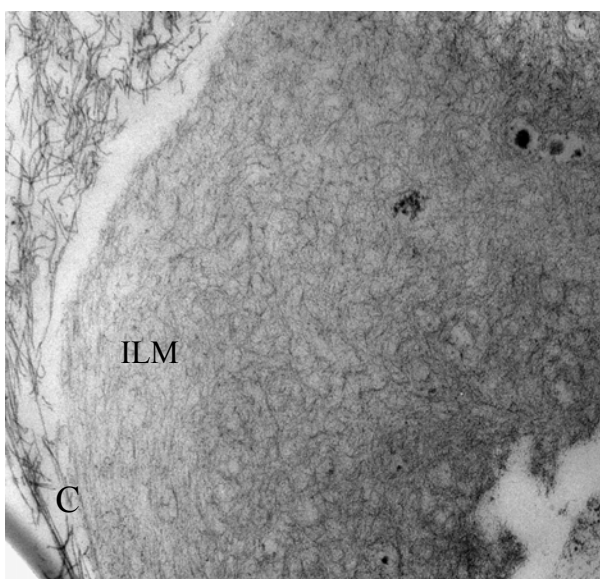


Abb. C:
 Retinale und vitreale Seite der
 ILM identifizierbar. Gleichmäßige,
 retikuläre Musterung der ILM.
 Vergrößerung 5,500-fach

3.2.1.2 Zelluläre und extrazelluläre Details

Die Ultradünnschnitte der kryofixierten epiretinalen Membranen erlauben keine Beurteilung zytoplasmatischer Zellkomponenten.

Die Übersicht in **Abbildung D** zeigt, dass sich Zellreste, zelluläre Fortsätze und Kollagenfibrillen voneinander abgrenzen lassen.

Die Kollagenfibrillen sind gleichmäßig in der extrazellulären Matrix verteilt und besitzen in der **Abbildung E** einen Durchmesser von 8 nm – 15 nm. Neben der kollagenen Matrix sind Zellauflagerungen abgebildet. Intrazelluläre Strukturen sind nicht erkennbar.

Die **Abbildung F** demonstriert bei 42.000-facher Vergrößerung, dass in den Zellresten keine zytoplasmatischen Strukturen definierbar sind. Zellkern, endoplasmatisches Retikulum und Intermediärfilamente sind beispielsweise nicht zu lokalisieren.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen: Präp. V 1- V 8 und VI 1 – VI 8



Abb. D-F:
Ultradünnschnitte von
epiretinalen Membranen
nach Kryofixierung durch
‚Impact Freezing‘.

Abb. D:
 Differenzierung von
 Zellresten, zellulären
 Fortsätzen und kollagener
 Matrix (Stern). Die ILM ist
 nicht abgebildet.
 Vergrößerung 9.600-fach

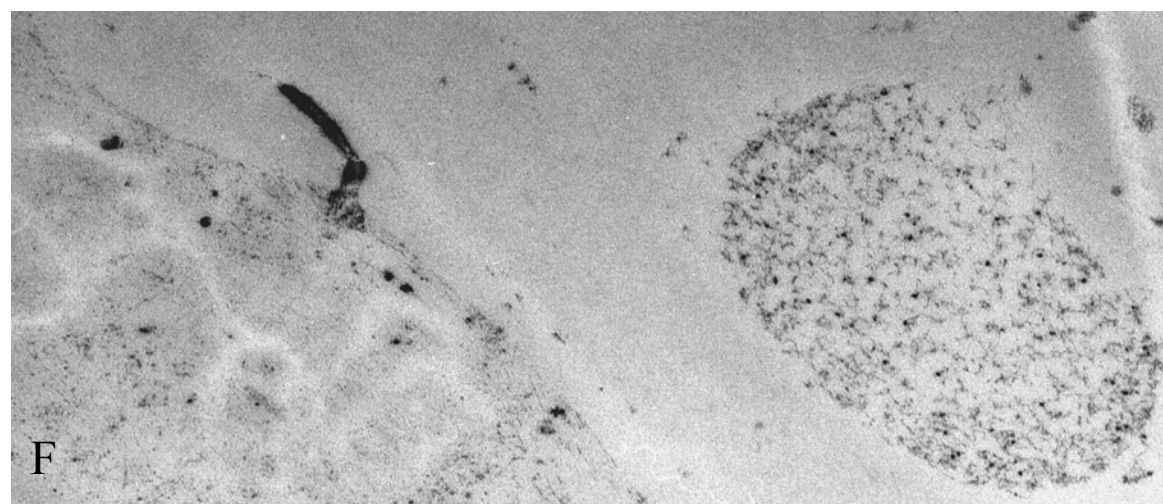
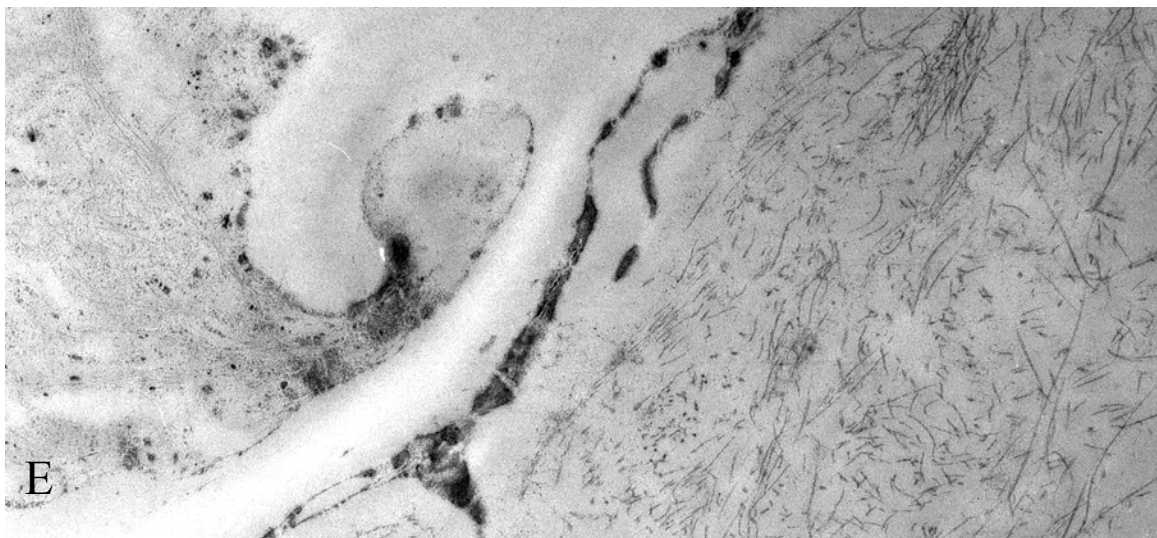


Abb. E: Kollagene Matrix mit Zellauflagerungen.
 Kollagenfibrillen mit einem Durchmesser von
 8 nm – 15 nm. Vergrößerung 24.000-fach

Abb. F: Ausschnitt zweier Zellen.
 Keine intrazytoplasmatischen Details
 definierbar. Vergrößerung 42.000-fach

3.2.2 Die Präparate der chemischen Fixierung

3.2.2.1 Der Aufbau epiretinaler Membranen

Die Ultradünnschnitte der chemisch in 2% pFA / 0,05% GA fixierten ERM zeigen eine gut erhaltene Ultrastruktur mit eindeutiger Schichtung des epiretinalen Gewebes.

Die **Abbildung G** zeigt die ILM als homogene Schicht, die keine retikuläre Zeichnung aufweist wie bei kryofixierten ERM, die aber durch die Lokalisierung von Kollagen- und Zellschicht eine Orientierung am Schnitt zulässt. Die retinale und die vitreale Seite der ILM kann im Bild lokalisiert werden. An der retinalen Seite ist ein kleiner Teil Müller'scher Zellen an der ILM zu erkennen. Die unterschiedliche Beschaffenheit der retinalen und vitrealen Seite der ILM ist bei chemisch fixierten ERM, eingebettet in Acrylat, weniger deutlich zu demonstrieren als bei den kryofixierten ERM. Der Strukturunterschied zwischen den beiden Seiten der ILM ist in der Abbildung G kaum bemerkbar. An die vitreale Seite der ILM grenzt eine zellreiche kollagene Matrix, wobei die Kollagenfibrillen direkt der ILM anliegen. Der Zellkern einer in der kollagenen Matrix eingelagerten Zelle ist abgebildet. Bei einer Vergrößerung von 7.200 können Details definiert werden wie beispielsweise die Kernmembran mit ihren Kernporen und dem Nukleolus.

Die **Abbildung H** zeigt eine ILM, die durch eine dünne Kollagenschicht von einer breiten Zellschicht getrennt ist. Diese Zellschicht besteht aus einer Vielzahl von übereinander gelagerten Zellausläufern. Die retinale Seite der ILM ist unregelmäßig begrenzt und stärker kontrastiert als die vitreale Seite, deren Abgrenzung zur kollagenen Matrix schwer fällt.

Die **Abbildung J** stellt die räumliche Beziehung der Zellen und ihrer Fortsätze zur ILM dar. Der kleine Ausschnitt der ILM ist schlecht abgrenzbar und ihre strukturelle Beschaffenheit nicht zu bewerten. Auch die Kollagenfibrillen der kollagenen Matrix sind nicht zu erkennen. Die Zellauflagerungen geben jedoch Hinweise zum Aufbau der ERM. Sie befinden sich auf der vitrealen Seite der ILM. Auffällig ist, dass der ILM eine schmale Schicht flacher Zellen direkt anliegt. Die Zellen und Zellfortsätze, die in die kollagene Matrix eingelagert sind oder dieser anliegen, stehen mit der dünnen, der ILM direkt aufliegenden Zellschicht in Verbindung. Kleine Zellausläufer stellen die Beziehung her. Orte des Zellkontaktes sind lokalisierbar. Die Zellmembranen sind kontrastreich und dem jeweiligen Zellausläufer eindeutig zuzuordnen.

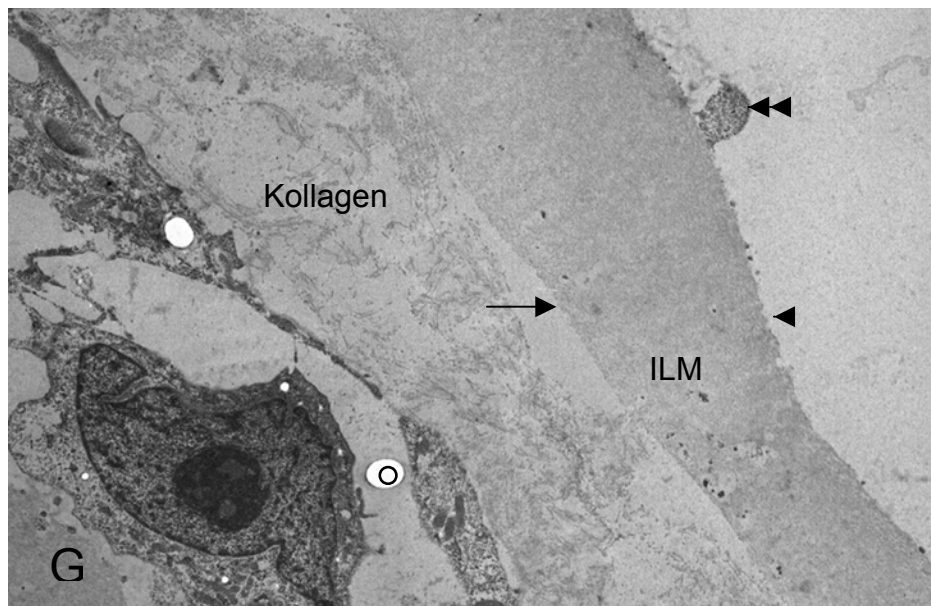


Abb. G - M:
Epiretinale
Membranen nach
chemischer
Fixierung in 2%
pFA / 0,05% GA

Abb. G:
ERM mit ILM,
kollagener Matrix
und eingelagerter
Zelle. Zellkern mit
Nukleolus (Stern).
Vakuolenbildung
(Kreis).
Müller'sche
Zellfortsätze
(Doppelpfeilspitze)
an retinaler Seite
der ILM
(Pfeilspitze),
vitrealer Seite der
ILM (Pfeil) glatt
begrenzt.
Vergrößerung

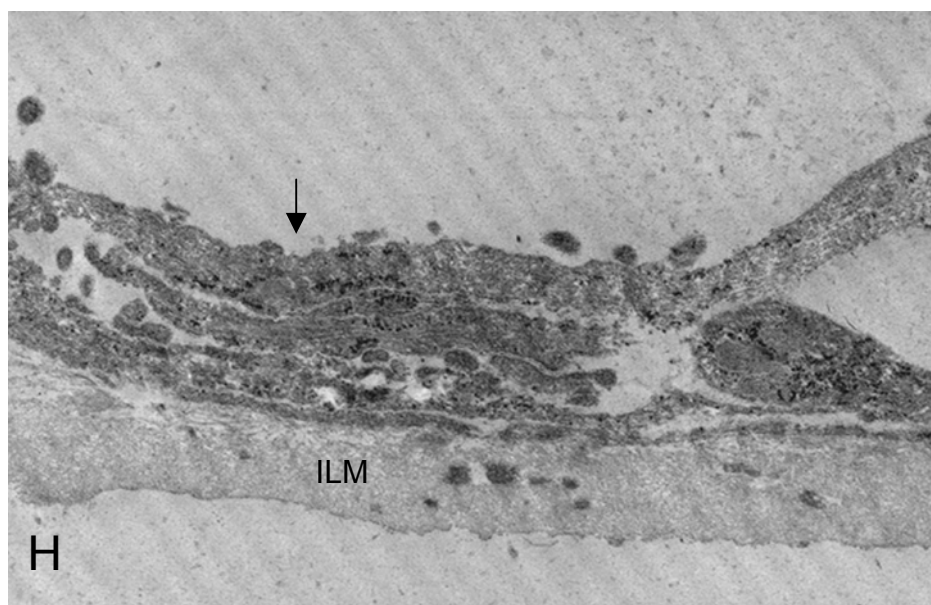


Abb. H:
Zellfortsätze auf
der vitrealen Seite
der ILM (Pfeil).
Dünne
Kollagenschicht
(Stern). Retinale
Seite der ILM
(Pfeilspitze)
unduliert und
scharf begrenzt.
Vergrößerung
30.210-fach

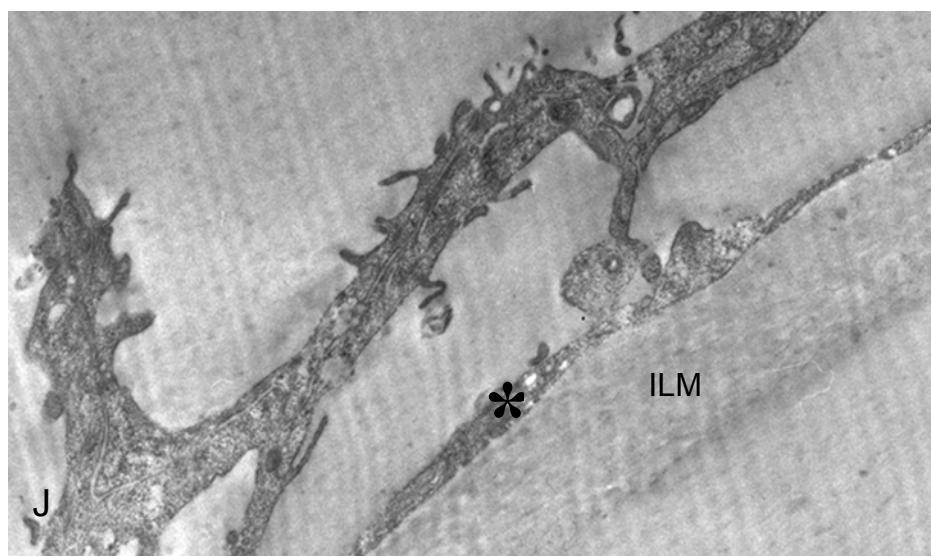


Abb. J:
Einzelne
Zellschicht der
vitrealen Seite der
ILM direkt
aufliegend.
Zellkontakte zu
Zellausläufern der
extrazellulären
Matrix.
Vergrößerung
14.400-fach

3.2.2.2 Differenzierung intrazytoplasmatischer Komponenten

Die Ultradünnschnitte chemisch in 2% pFA / 0,05% GA fixierter ERM lassen die Lokalisation von intrazytoplasmatischen Zellbestandteilen wie Zellkern, Nukleolus, Endoplasmatisches Retikulum (ER) und Intermediärfilamenten zu.

Die **Abbildung K** zeigt den Ausschnitt einer Zelle mit ihrem Zellkern. Gut erkennbar ist der Nukleolus und das Kernchromatin, das als kontrastreiche Ansammlungen am Rand der Kernmembran identifiziert werden kann. Kleine Aussparungen des Kernchromatins deuten auf die Kernporen hin. Auch der perinukleäre Raum und die Kernmembran, die bei fehlender OsO_4 - und Uranylazetat-Postfixierung negativ dargestellt ist, kann entlang der Kernmembran als heller, kontrastfreier Streifen identifiziert werden. Der Zellkern ist eindeutig vom Zytoplasma abgegrenzt.

Intrazytoplasmatische Filamente wurden durch die milde chemische Fixierung gut erhalten. Sie sind in der **Abbildung L** parallel angeordnet und besitzen einen Durchmesser von 8 nm – 10 nm.

Die membranartigen Strukturen der **Abbildung M** entsprechen dem ER. Es kann keine sichere Aussage darüber getroffen werden, ob es sich um raues oder glattes ER handelt. Der Nukleolus des Zellkerns, die Kernmembran und die Zellmembran sind definierbar.

Die Definition der zytoplasmatischen Strukturen epiretinaler Membranen, die in einer Lösung aus 2% pFA und 0,05% GA fixiert und in Acrylate eingebettet wurden, ist jedoch beschränkt. Es konnten keine Mitochondrien oder Golgi-Komplexe dargestellt werden.

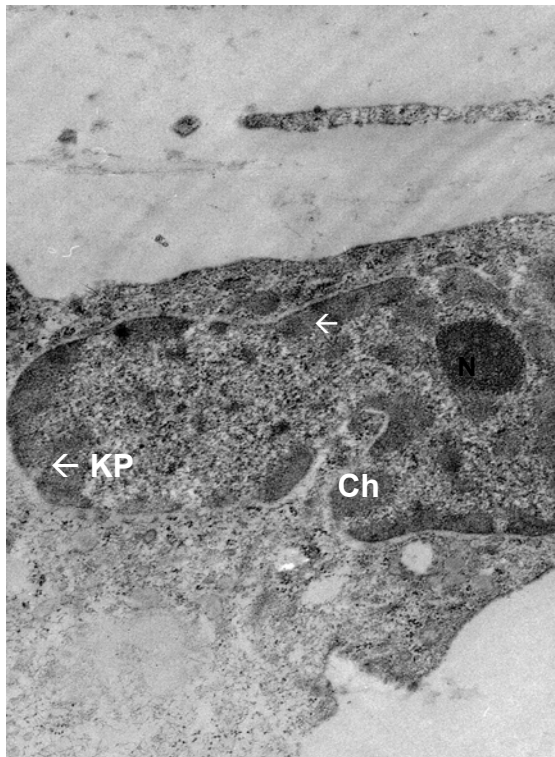


Abb. K: Zellkern mit Nukleolus (N), negativ dargestelltem, perinukleärem Raum (PR), der Kernmembran anliegendem Chromatin (Ch), lokalisierbaren Kernporen (KP). Vergrößerung 19.000-fach

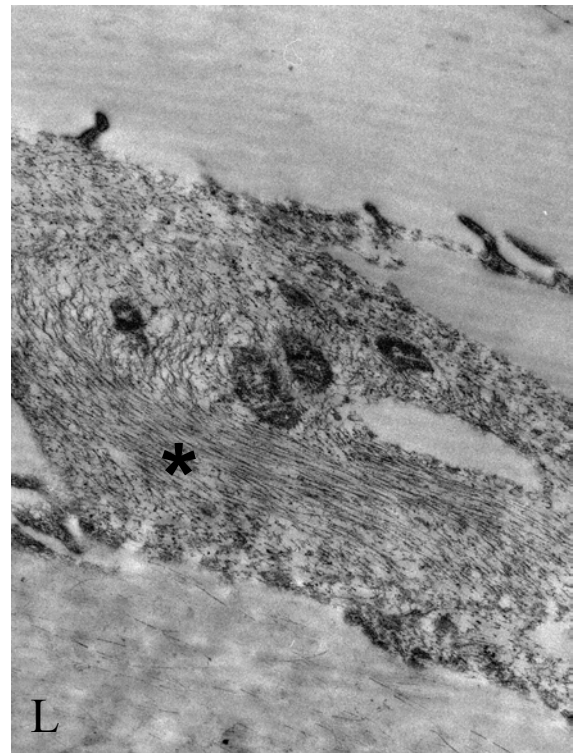


Abb. L: Intrazytoplasmatische Filamente (Stern) mit einem Durchmesser von 8 nm – 10 nm. Vergrößerung 19.000-fach

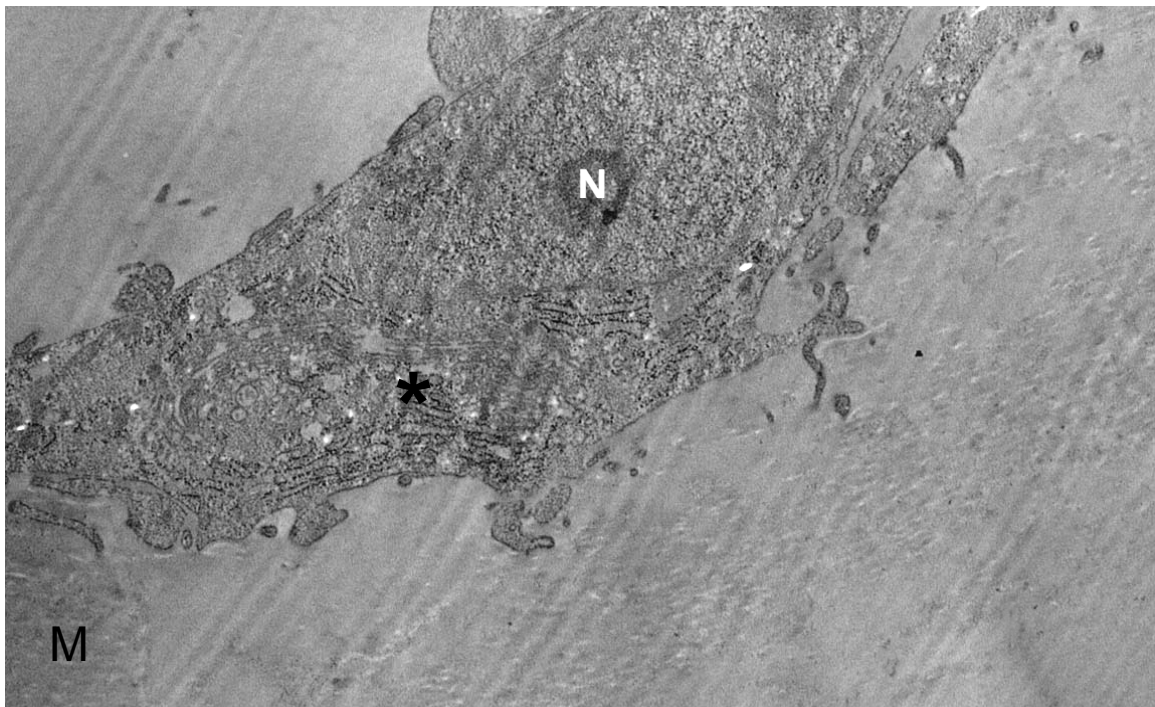


Abb. M: Zelle mit Zellkern, Nukleolus (N) und Endoplasmatischem Retikulum (Stern). Vergrößerung 9.600-fach

4. DISKUSSION

4.1 Überlegungen zu Ergebnis und Intention der Arbeit

4.1.1 Auswertung der Ergebnisse

4.1.1.1 Morphologischer Vergleich kryofixierter und chemisch fixierter ERM

Vergleicht man die lichtmikroskopischen Aufnahmen der unterschiedlich fixierten ERM, so lässt sich herausstellen, dass die Semidünnschnitte der kryofixierten Membranen zerrissen sind. Sie sind an der Stelle zerstört, an der sich das Filterpapier mit dem Gewebe befindet. Dies trifft ohne Ausnahme für alle kryofixierten Präparate zu. Neben den Rissen, die vermutlich durch den Schneidprozess durch das Filterpapier verursacht wurden, existieren auch gleichmäßig runde und unregelmäßig ausgestanzt wirkende Aussparungen des Einbettmediums innerhalb der Membranstrukturen. Diese können aufgrund von Form und Lokalisation auf Eiskristallbildungen zurückgeführt werden. Warum weisen alle Präparate der Kryofixierung derartige Artefakte auf, so dass nur ein Teil der epiretinalen Membranen erhalten geblieben ist?

Die Lokalisation und die Einheitlichkeit der Zerstörung deuten auf das Filterpapierplättchen hin, das als Trägersubstanz demnach nicht empfohlen werden kann. Denkbar ist, dass es als Fremdkörper die adäquate Wärmeableitung während der Kryofixierung behindert, ein Vorgang, der nur wenige Millisekunden dauert. Jede Verminderung der Abkühlungsrate resultiert in einem erhöhten Risiko für destruiende Eiskristallbildungen [Elder, 1989]. Auffällig ist, dass in einigen der lichtmikroskopischen Aufnahmen gut erhaltene neben zerstörten Membranstrukturen liegen. Andererseits existieren kryofixierte Präparate, die eine Differenzierung zwischen retinaler und vitrealer Seite der ILM und somit durch relativ gute Strukturhaltung eine Orientierung innerhalb des Gewebes erlauben. Die kryofixierten Präparate, obwohl auf lichtmikroskopischen Abbildungen nur begrenzt beurteilbar, bieten ein Nebeneinander von zerstörten und erhaltenen Membranstrukturen. Das Auffinden von Zellkernen war nicht gelungen.

Wenige kryofixierte Präparate weisen Ähnlichkeiten mit Membranen der im pFA/GA-Gemisch fixierten Präparate auf, die auf lichtmikroskopischer Ebene zufriedenstellende Ergebnisse liefern. Die Semidünnschnitte der chemisch fixierten Präparate sind hingegen nicht zerrissen. Es sind keine ‚Löcher‘ im Einbettmedium sichtbar. Die ILM lässt sich von der kollagenen Matrix abgrenzen, die retinale und die vitreale Seite der ILM ist gut definierbar und die Zellkerne sind nicht nur lokalisierbar, sondern lassen Details wie Nukleoli erkennen.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigen die begrenzte Auswertbarkeit kryofixierter Präparate. Bedenkt man, dass die Semidünnschnitte bei einer Schnittdicke von 500 nm zerrissen waren, wird verständlich, wie schwierig das Anfertigen qualitativ hochwertiger Ultradünnschnitte gewesen ist. Für ultrastrukturelle Untersuchungen beträgt die Schnittdicke weniger als ein Zehntel der Semidünnschnitte, ungefähr 50 nm. Die Abbildungen kryofixierter epiretinaler Membranen zeigen, dass die ILM gut von der Kollagenschicht abgegrenzt werden kann, dass die retinale Seite der ILM unregelmäßig aufgebrochen erscheint und die vitreale Seite der ILM glatt der kollagenen Matrix anliegt. Auffällig ist jedoch die Strukturierung der ILM, die sich nicht homogen darstellt, sondern einem netzähnlichen Muster entspricht. Diese retikuläre Zeichnung ist bei den Aufnahmen der chemisch fixierten Membranen weniger gut erkennbar. Angesichts dessen, dass die Kollagenfibrillen des kryofixierten Gewebes gut erhalten sind, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der retikulären Musterung nicht um Artefakte sondern um eine Annäherung an den nativen Zustand der ILM handelt. Außer der ILM und den Kollagenfibrillen, die einen Durchmesser von 8 nm bis 15 nm besitzen, sind jedoch keine weiteren Strukturen der kryofixierten ERM beurteilbar. Zellreste können abgebildet werden, Einzelheiten sind jedoch nicht definierbar. Es ist davon auszugehen, dass die zellulären Bestandteile der ERM bei der Kryofixierung zu großen Schäden genommen haben, um dargestellt werden zu können.

Die elektronenmikroskopischen Abbildungen der chemisch fixierten Präparate weisen wesentliche Unterschiede zu den Abbildungen der Kryofixierung auf. Hierzu gehört Erscheinung und Verteilung der Kollagenfibrillen. Die einzelnen Kollagenfibrillen kryofixierter Membranen sind gleichmäßig verteilt und deutlich voneinander abgrenzbar. Die einzelnen Fibrillen chemisch fixierter Membranen sind zu kleinen Haufen geordnet und schlechter zu differenzieren. Des Weiteren weist die ILM der kryofixierten Präparate neben ihrer retikulären Strukturierung eine stärker undulierte retinale Seite auf als die ILM der chemisch fixierten ERM. Durch die milde chemische Präparation konnten jedoch regelmäßig zelluläre Einzelheiten sichtbar gemacht werden, die genügen können, um Zellen durch ihre ultrastrukturelle Erscheinung zu identifizieren. Dazu gehören die Zellkerne mit Nukleolus und Chromatin, die Kernmembran mit perinukleärem Spalt und Kernporen, die Intermediärfilamente mit einem Durchmesser von 8 nm bis 10 nm sowie membranartige Strukturen im Zytoplasma, welche dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) zugeordnet werden können. Das ER liegt der Kernmembran dicht an. Es lässt sich jedoch nicht feststellen, ob es sich um raues oder glattes ER handelt. Weitere zytoplasmatische Details fehlen. Weder Mitochondrien noch Golgi-Komplexe konnten auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen chemisch fixierter Membranen abgebildet werden.

4.1.1.2 Bewertung der Präparationsverfahren

Sowohl der Vergleich der Ultrastruktur als auch die Beurteilung der Reproduzierbarkeit der hier gegenübergestellten Präparationsverfahren epiretinaler Membranen stellt die Überlegenheit der milden chemischen Präparationsmethode heraus. Die Reduktion des GA im Fixierungsmedium auf ein Minimum von 0,05% und der absolute Verzicht auf OsO_4 vermindern zwar den Kontrast und den Erhalt lipidreicher Strukturen wie dem Endoplasmatischen Retikulum oder den Mitochondrien, andere Strukturen wie Zellkern, Kernchromatin und Nukleolus sowie Intermediärfilamente und Kollagenfibrillen sind jedoch gut definierbar. Auch die technische Ausführung erlaubt eine einfach und sicher zu reproduzierende, routinierte Durchführung der chemischen Präparation. Die chemische Fixierung epiretinaler Membranen mit einer Aldehydkombination von 2% pFA und 0,05% GA kann aus morphologischer Sicht empfohlen werden. Die Einfachheit der Durchführung und die Identifizierbarkeit zellulärer Details spricht für eine routinierte Anwendung in der Immun-Elektronenmikroskopie.

Die Lokalisation der zu untersuchenden Antigene sollte jedoch im Bereich der extra- oder intrazellulären Strukturen erwartet werden, deren Abbildung mit Sicherheit gewährleistet werden kann. Zellorganellen, die sich aus membranösen und lipidreichen Strukturen zusammensetzen, bedürfen einer verbesserten morphologischen Erhaltung. Der Verzicht auf OsO_4 und die Durchführung der Präparation bei $+4^\circ\text{C}$ wirken sich auf die Erhaltung von Mitochondrien und Golgi-Komplexen deutlich aus. Die Entscheidung, ob die ultrastrukturelle Basis der hier verwendeten pFA/GA-Fixierung und Einbettung in Acrylat den immunzytochemischen Anforderungen genügt, muss im Kontext des jeweils nachzuweisenden Antigens beurteilt werden.

Die Kryotechniken, entsprechend des hier angewandten Protokolls, sind aufgrund von Eiskristallbildung und Destruktion der Dünnschnitte nicht für die Routineverarbeitung epiretinaler Membranen in der Immunelektronenmikroskopie geeignet. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu klären, inwiefern die technischen Schwierigkeiten beseitigt werden können und ob Kryomethoden für die Aufbereitung von epiretinalem Gewebe in der Immunzytochemie geeignet sind. Die hervorragende Erhaltung von ILM und Kollagenfibrillen lässt auf eine besondere Eignung der Kryotechniken schließen. Hinsichtlich routinierter Handhabung und morphologischer Erhaltung müssen die Kryofixierung, die Gefriersubstitution und die Tieftemperatureinbettung epiretinaler Membranen wesentliche Verbesserungen erfahren.

4.1.1 Einordnung der Ergebnisse in die Literatur

4.1.2.1 Fixierung epiretinaler Membranen

Dass eine chemische Fixierung die Durchführung von immunologischen Nachweisreaktionen ermöglicht, konnten Studien an epiretinalem Gewebe bereits demonstrieren. Dabei wurden überwiegend Aldehydkombinationen aus pFA und GA verwendet, häufig in einem Verhältnis aus 4% pFA / 0,25% GA [Campochiaro, 1992; Viores, 1992], 4% pFA / 0,1% GA [Casaroli-Marano, 1999] und 2% pFA / 2% GA [Viores, 1990b]. Nur selten ist auf den Gebrauch von GA vollständig verzichtet und das Gewebe in 4%iger pFA-Lösung fixiert worden [Schneeberger, 1997]. Derzeit existiert keine Studie über ERM, in der das Gewebe mit der geringen Konzentration von nur 2% pFA / 0,05% GA fixiert worden ist. Ausgehend von diesen verschiedenen chemischen Fixierungen sind die ERM entweder nach konventionellem Standardverfahren [Casaroli-Marano, 1999; Viores, 1990b] oder nach der PLT-Methode [Casaroli-Marano, 1999; Campochiaro, 1992] weiterverarbeitet und in Lowicryl K4M eingebettet worden. Der Einsatz von Unicryl in der Präparation ERM ist ebenfalls nicht dokumentiert. In seltenen Fällen wurde nach einer chemischen Vorfixierung mit Aldehyden eine Kryofixierung durchgeführt [Casaroli-Marano, 1999; Chen, 1997]. Diese kryofixierten ERM sind jedoch nicht in durch ‚Low-Temperature‘ Methoden substituiert und bei tiefen Temperaturen in Kunststoff eingebettet worden. Sie wurden, ebenso wie chemisch nicht vorbehandelte, kryofixierte ERM [Esser, 1993], der Kryo-Ultramikrotomie zugeführt.

4.1.2.2 Immunzytochemie und Immunhistologie

Bis auf wenige Ausnahmen wurden mit Dünnschnitten der Kryo-Ultramikrotomie nur immunhistochemische [Chen, 1997; Baudouin, 1990] und keine immunzytochemischen Untersuchungen [Casaroli-Marano, 1999] durchgeführt, da die Morphologie dieser Präparate auf elektronenmikroskopischer Ebene häufig keine eindeutige Zuordnung von immunologischen Nachweisreaktionen erlaubt. Für die Immunhistochemie ERM sind Aufnahmen von Semidünnschnitten der Kryo-Ultramikrotomie ausreichend. Auch Dünnschnitte von Paraffineinbettungen mit einer Schnittdicke von 4 μm bis 6 μm werden häufig für lichtmikroskopische Aufnahmen immunhistochemischer Studien verwendet [Charteris, 1992; Schwartz, 1996; Bochaton-Piallat, 2000; Meyer, 2002]. Die verfügbaren Informationen auf dem Gebiet der Immunologie ERM basieren derzeit vorrangig auf immunhistochemischen Analysen. Diese könnten in naher Zukunft durch immunzytochemische Untersuchungen ergänzt werden. In diesem Zusammenhang kommt der Anwendung milder chemischer Präparationsverfahren bzw. der Durchführung von Gefriersubstitution und ‚Low-Temperature‘ Einbettung eine zentrale Bedeutung zu.

4.2 Überlegungen zu Technik und Methodik

4.2.1 Technische Probleme

4.2.1.1 Die Wahl der Trägersubstanz

Ohne das Verwenden einer Trägersubstanz war der Einsatz von Kryomethoden für die Präparation epiretinalen Gewebes nicht möglich. Vorversuche konnten zeigen, dass die Membranen auf dem Kupferspiegel festfroren, wollte man sie mittels ‚Slam Freezing‘ kryofixieren. Bemühungen, sie unbeschädigt zu lösen, schlugen fehl. Auch Versuche, sie ohne Trägersubstanz durch ‚Plunging‘ zu fixieren, blieben erfolglos. Grund dafür sind die Größenverhältnisse gepeelter ERM. Mit einer durchschnittlichen Breite von nur 10 μm und einer Länge von 1 mm bis 3 mm weisen sie eine Transparenz und Adhäsionsneigung auf, dass sie mit dem bloßen Auge kaum sichtbar sind und die üblichen Hinweise zur Handhabung von Gewebe während der Kryopräparation versagen. Kleine Membranteile wurden aus diesem Grund mit Toluidinblau angefärbt, bevor sie der Vorbehandlung mit Saccharose und 1-Hexadecene zugeführt worden sind. Die Färbung verlor sich jedoch während des Substitutionsvorgangs in Azeton, so dass sich eine Lokalisation der Membranen für das Anfertigen der Semidünnschnitte wieder erschwerte. Problematischer gestaltete sich jedoch die Eigenschaft der Gewebestücken, an Oberflächen aus Glas, Metall und Holz haften zu bleiben. So dass eine Trägersubstanz gefunden werden musste, die während der gesamten Präparation mitgeführt werden konnte.

Es wurden herkömmliche Gelatineplättchen ausgetestet, die sich jedoch nicht stabil verhielten. Agarplatten, durchschnittlich 1,0 cm x 0,5 cm groß, schienen zunächst geeignet, bis sich beim Trimmen für das Anfertigen von Semidünnschnitten zeigte, dass die Blöcke entlang des Agarplättchens in zwei Teile brachen. Vermutlich weil die Agarplatten nicht am Polymerisationsprozess teilnahmen, sondern als undurchdringbarer Fremdkörper im zu polymerisierenden Medium lagen und dieses in zwei Hälften trennten. Deshalb sollte die gesuchte Trägersubstanz über Poren verfügen, durch welche eine Polymerisierung ablaufen könnte, um auf diese Weise die Einheit des Blockes zu gewährleisten. Feinporiges Filterpapier schien den Ansprüchen zu genügen. Erst die licht- und elektronenmikroskopischen Abbildungen dieser Arbeit zeigen, dass das epiretinale Gewebe an vielen Stellen durch Eiskristallbildungen zerstört worden ist und die Schnitte an der Stelle, an der das Filterpapier im Einbettmedium lag, während des Schneideprozesses zerrissen wurden. Diese Beobachtungen machen deutlich, dass Filterpapier als Trägersubstanz für die Anwendung von Kryomethoden an epiretinalem Gewebe nicht empfohlen werden kann. Es stellt bei den kryofixierten Präparaten die wichtigste Fehlerquelle für Gewebedestruktionen sowie für schlechte Semi- und Ultradünnschnittqualität dar. Der Erhalt morphologischer

Strukturen nach Kryofixierung kann vor diesem Hintergrund nicht beurteilt werden. Deshalb ist es notwendig, dieses Präparationsverfahren mit Verwendung einer geeigneteren Trägersubstanz zu wiederholen. Ein idealer Träger sollte klein genug sein, um die Wärmeableitung bei der Kryofixierung nicht zu behindern, sollte das Gewebe jederzeit lokalisierbar machen, an dem Vorgang der Polymerisierung teilnehmen und eine gleichmäßig schneidbare Konsistenz besitzen. Denkbar wäre ein Nylonfaden. Wird dagegen nach einer planen Trägersubstanz gesucht, könnte eventuell auch eine dünne Schicht vorpolymerisierten Einbettmediums den genannten Anforderungen entsprechen. Allerdings muss damit gerechnet werden, dass jede neue Trägersubstanz neue Schwierigkeiten nach sich ziehen kann. Deshalb wäre eine Handhabung epiretinaler Membranen ohne die Notwendigkeit, während der Kryopräparation einen Träger mitführen zu müssen, zweifelsfrei jeder anderen Lösung vorzuziehen.

4.2.1.2 Der Gefrierschutz

Um das Risiko einer Eiskristallbildung zu vermindern wurden die epiretinalen Membranen, die der Kryofixierung zugeführt werden sollten, mit kryoprotektiven Medien vorbehandelt. Der Einsatz von penetrierenden sowie nicht-penetrierenden Kryoprotektoren ist ein Kompromiss zwischen Gefrierschutz und osmotischen, physikalischen als auch strukturellen Veränderungen. Saccharose und 1-Hexadecene sind nicht-penetrierende Substanzen. Sie sollten den Wasseranteil, der das Gewebe umgab, verringern, ohne die Komposition der Membranen nachhaltig zu beeinflussen. Ihre jeweilige Expositionszeit wurde aus diesem Grund auf das Minimum von einer Minute beschränkt. Die Verwendung von Saccharose ist in der Immunzytochemie verbreitet, da die Aktivität immunologischer Reaktionen erfolgreich erhalten werden kann [Tokuyasu, 1973]. 1-Hexadecene hingegen, eine stark hydrophobische Substanz, findet bei der Methode des ‚High-Pressure Freezing‘ Anwendung und verbessert nachweislich die Qualität des fixierten Gewebes, obwohl es nicht mit dem wässrigen Medium innerhalb der Zellen reagiert [Wilson, 1998]. Nicht nur einzelne Zellen wie Lymphozyten, Erythrozyten, hämatopoetische Stammzellen oder Spermien werden kryofixiert, aufbewahrt und revitalisiert, sondern auch Leber-, Pankreas- Nieren- und Knorpelgewebe kann erfolgreich durch Kryomethoden fixiert werden [Benayan, 1987; Hunziker, 1987]. Es lässt sich vermuten, dass größere Mengen kryoprotektiver Substanzen in der Lage wären, das Wasser im Gewebe ERM ohne die Ausbildung von Eiskristallen in einen vitrealen Zustand zu überführen. Die osmotischen und toxischen Effekte sprechen jedoch gegen einen übermäßigen Einsatz von Kryoprotektoren. Die Schwierigkeit besteht darin, ein geeignetes Verfahren und eine geeignete Konzentration kryoprotektiver Substanzen zu finden, die den Erfordernissen ultrastruktureller sowie immunzytochemischer Untersuchungen entspricht. Zu dieser Problematik können zwei Lösungsansätze herausgearbeitet werden:

Erstens, die Toleranzgrenze für ein Gefrierschutzmedium liegt höher, wenn es dem Gewebe in Raten zugesetzt wird und wenn gleichzeitig die Temperatur sinkt [Rall, 1985]. Die Konzentration der jeweiligen Substanz darf die toxische Grenze nicht überschreiten. Für die Immunzytochemie und die Anwendung von Saccharose entspricht diese Grenze noch immer der von Tokuyasu empfohlenen 2,3 M Saccharose-Lösung [Tokuyasu, 1973]. Zweitens, eine der Kryofixierung vorausgehende Lufttrocknung könnte den Wassergehalt des Gewebes senken. Untersuchungen an embryonalen Reiszellen demonstrierten, dass nach einer Vorbehandlung mit Saccharose in aufsteigenden Konzentrationen über mehrere Tage, einer Lufttrocknung für wenige Stunden und einer Kryofixierung durch ‚Plunging‘ die Zellen revitalisiert werden konnten und sich regenerationsfähige Pflanzen entwickelten. Dieser Erfolg wurde im wesentlichen der Lufttrocknung zugeschrieben [Zhang, 2001].

4.2.2 Methodische Details

4.2.2.1 Die Kryofixierung

Nicht nur die Vorbehandlung mit kryoprotektiven Substanzen spielt für den Erfolg einer Kryofixierung eine wichtige Rolle, auch die Wahl der Methode sowie die unverzügliche Verarbeitung des Gewebes sind von Bedeutung. Bereits nach 5 Minuten muss mit postmortalen Veränderungen gerechnet werden, von denen Mitochondrien und Golgi-Komplexe zuerst betroffen sind [Reimer, 1967a]. Obwohl sich diese Destruktionen zunächst nur als Festigkeitsänderungen bemerkbar machen, können sie in Acrylat-Einbettungen aufgrund von Volumenschwankungen während der Polymerisation zu Vakuolisierungen und Aufhellungen des Zytoplasmas führen. Deshalb ist es umso wichtiger, eine an das Gewebe angepasste Fixierungsmethode zu etablieren, um einen routinierten Ablauf der Präparation gewährleisten zu können. Zur Kryofixierung bei Präparaten, bei denen sich die zu untersuchende Region an der Oberfläche befindet, ist die Technik des ‚Impact Freezing‘ die Methode der Wahl [Elder, 1989]. Fraglich ist in diesem Zusammenhang, ob die unteren Zellschichten durch den Aufprall auf dem Metallspiegel mechanisch geschädigt werden. Die Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchungen können diese Frage nicht beantworten, da wegen der Destruktion der Dünnschnitte durch den Gebrauch von Filterpapier als Trägersubstanz die Erstellung von Serienschnitten nicht möglich gewesen ist. Hinzu kam, dass ERM während des Substitutionsvorgangs vom Filterpapier abgeschwommen und auf den Boden der FT-Kapseln gesunken sind. Durch die unbestimmte Lage der Membranen im Einbettmedium konnte keine Aussage bezüglich Metallspiegel-zugewandter oder Metallspiegel-abgewandter Seite getroffen werden. Die Methode des ‚Plunging‘ kann das Risiko einer beim ‚Slamming‘ eventuell entstehenden mechanischen Schädigung des Gewebes eliminieren und Gewebeschichten von 10 μm bis 30 μm zufriedenstellend kryofixieren. Aufgrund der leichten Anwendbarkeit ist das ‚Plunging‘ im Bereich der

Kryofixierung die am häufigsten verwendete Methode [Quintana, 1994]. Die technische Notwendigkeit, für die Kryofixierung ERM durch ‚Plunging‘ oder ‚Impact Freezing‘ eine Trägersubstanz mitzuführen, wirkte sich jedoch nachteilig auf die Membranstruktur aus. Das impliziert die Frage, ob es alternative Kryofixierungstechniken gibt, bei denen auf einen Träger verzichtet werden kann. ‚Jet Freezing‘ und ‚Spray Freezing‘ sind Alternativen, die für epiretinales Gewebe wenig geeignet erscheinen, da diese für Zellsuspensionen empfohlen werden. Das Prinzip der ‚High-Pressure‘ Kryofixierung erscheint andererseits aufgrund exzellenter Erhaltung der Ultrastruktur ohne die Ausbildung von Eiskristallformationen in Zellschichten von 150 μm bis 350 μm Tiefe empfehlenswert. Das Plazieren und Wiederauffinden der epiretinalen Membranen in den speziellen Hochdruckkammern ohne eine geeignete Trägersubstanz könnte jedoch zu erneuten technischen Schwierigkeiten führen. Des Weiteren müsste bedacht werden, dass derzeit keine Klarheit darüber besteht, welche zellulären Strukturveränderungen durch die Anwendung von Überdruck (> 2000 bar) induziert werden können [Wilson, 1998; Quintana, 1994].

4.2.2.2 Die chemische Fixierung

Verglichen mit der Kryofixierung, die in weniger als 0,1 ms alle zellulären Prozesse stoppen und in dem jeweiligen Stadium des Zellmetabolismus konservieren kann, ist die chemische Fixierung mit Aldehydkombinationen eine 10.000 Mal langsamere Methode [Sitte, 1989]. Der wichtigste, direkte Effekt chemischer Fixierungsmedien besteht in der Zerstörung von Zellmembranpumpen mit konsekutiver Permeabilitätsstörung. Noch bevor die chemische Fixierung durch Quervernetzungen wirksam wird, treten durch einen ungehinderten Ionenverlust sekundäre, strukturelle Veränderungen auf [Kellenberger, 1992]. Hinzu kommt, dass jede Art von fixierenden Chemikalien die Antigenität des Gewebes reduziert [Schwarz, 1989]. Wenn dennoch eine chemische Fixierung stattfinden soll, um das Präparat vor destruirenden Einflüssen einer Dehydrierung, Infiltration und Einbettung zu schützen, ist die Verwendung von pFA von Vorteil. Denn pFA dringt schneller ins Gewebe ein und verändert die biochemische Zusammensetzung weniger als GA. Eine Kombination aus beiden Aldehyden ist jedoch ratsam, weil pFA die Strukturen nur vorübergehend fixiert und GA diese von pFA zunächst reversibel fixierten Strukturen durch Quervernetzungen anhaltend stabilisieren kann. Außerdem ist die Ultrastruktur bei pFA- fixiertem Gewebe insbesondere dann schlecht erhalten, wenn auf eine OsO_4 -Postfixierung aufgrund der Antigenität verzichtet werden musste. Geringe Mengen von GA ($< 0,5\%$), lässt man es für die kurze Dauer von weniger als 30 Minuten einwirken, können in einem solchen Fall die Morphologie verbessern, ohne die Antigenität wesentlich zu verändern [Newman, 1999].

Karnovsky, der als erster die Kombination aus GA und pFA als fixierendes Medium vorgeschlagen hatte [Karnovsky, 1965], empfahl 1965 eine Mischung aus 4%

Paraformaldehyd und 5% Glutaraldehyd. Derzeit werden sowohl für GA als auch für pFA niedrigere Konzentrationen verwendet. Die Durchschnittswerte liegen für pFA bei 0,5% bis 2,0% und für GA bei 1,0% bis 3,0% [Glauert, 1975]. Die durch eine GA-Fixierung verursachten Quervernetzungen von Proteinen mindern die immunologische Reaktivität. Da der Gebrauch von GA nur dem Erhalt der Morphologie dient, sollte auf GA in immunzytochemischen Untersuchungen weitestgehend verzichtet werden. Wie stark kann GA im Fixierungsmedium für immunologische Nachweisreaktionen minimiert werden, so dass die Feinstruktur des Gewebes zufriedenstellend erhalten bleibt und Informationen zur Lokalisation und Definition einzelner Details liefert? Um diese Frage zu beantworten, wurde GA in der vorliegenden Arbeit auf die geringe Menge von 0,05% reduziert und in Kombination mit 2% pFA zur Anwendung gebracht.

In immunzytochemischen Studien wird oft auf den Gebrauch von OsO_4 verzichtet [Campochiaro, 1992; Casaroli-Marano, 1999], da es mit Proteinen reagiert und auf diese Weise die Antigenität reduzieren kann. Aus diesem Grund ist OsO_4 bei den Präparationsverfahren der vorliegenden Arbeit weggelassen worden. Ein absoluter Verzicht auf OsO_4 sollte jedoch nicht unkritisch übernommen werden. Einige wenige Studien zeigen, dass es membranstabilisierend wirken und die Lipidextraktion des Substitutionsmedium verringern kann, ohne die Antigenität zu zerstören, wenn es zum richtigen Zeitpunkt in erforderlich geringer Konzentration eingesetzt wird [Hernandez-Verdun, 1991].

4.2.2.3 Die Entwässerung

Entwässerungsmedien extrahieren häufig Lipide und fügen dem Gewebe auf diese Weise Schaden zu. Um diesem Problem entgegen zu wirken, gibt es im Wesentlichen drei Möglichkeiten:

- (1) Die Entwässerung wird von der Raumtemperatur einer konventionellen Dehydrierung in den Bereich tiefer Temperaturen verlegt. Deshalb ist in der vorliegenden Arbeit die Substitution kryofixierter Präparate bei -90°C und die chemisch fixierter Präparate bei $+4^\circ\text{C}$ durchgeführt worden.
- (2) Der Gebrauch von Ethanol wird häufig durch Azeton ersetzt, denn Phospholipide sind weniger löslich in Azeton als in Ethanol oder Methanol [Berryman, 1990]. Ihre Erhaltung trägt nicht nur zur Verstärkung des Membrankontrastes bei, sondern auch zur Verbesserung der Antigenität. Vergleiche zur Lipidextraktion bei Raumtemperatur ergaben, dass Azeton nur 5% der Lipide entzieht und dem Gewebe mehr Schaden zufügt als Methanol, das ungefähr 15% bis 45% der Lipide extrahiert [Weibull, 1984].
- (3) Dem Substitutionsmedium Methanol kann, im Gegensatz zu Azeton, geringe Mengen von Uranylazetat (UA) zugesetzt werden, um die Lipidextraktion zu unterbinden und die Zellmembranen zu stabilisieren [Humbel, 1989].

Die Verwendung von Uranylazetat (UA) wird für eine verbesserte Morphologie der Membranstrukturen durch den Erhalt von Phospholipiden durch eine Vielzahl von Studien empfohlen [van Lookeren, 1991; Horowitz, 1990; Humbel, 1989; Berryman, 1990]. Es existieren jedoch widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses von UA auf die Antigenität [Bittermann, 1992; Humbel, 1989; Berryman, 1990].

Neben UA werden auch GA und OsO_4 dem Substitutionsmedium zugesetzt, insbesondere wenn durch Kryofixierung auf eine initiale chemische Fixierung verzichtet wurde. Von einer 2%- bis 5%-igen OsO_4 -Postfixierung im Sinne der konventionellen Standardpräparation ist aus den bereits genannten Gründen bei immunzytochemischen Untersuchungen abzusehen. Es besteht jedoch die Möglichkeit, kryofixierte Präparate beispielsweise in reinem Azeton zu substituieren und in einem letzten Schritt das Substitutionsmedium gegen ein Gemisch aus Azeton und 1% OsO_4 auszutauschen. Nachteilig ist dabei jedoch, dass der Einsatz von OsO_4 aufgrund photoabsorbierender Eigenschaften den Gebrauch von Acrylaten verbietet und stattdessen eine Einbettung in Epon erforderlich macht, deren Polymerisation bei hohen Temperaturen ablaufen muss. UV-Licht Polymerisationen sind nicht für OsO_4 -fixierte Präparate geeignet, weil diese das UV-Licht absorbieren können und auf diese Weise eine inhomogene Polymerisierung bewirken [Hobot, 1989]. Hernandez-Verdun et al. konnten für die Zugabe von OsO_4 zum Substitutionsmedium Azeton jedoch demonstrieren [Hernandez-Verdun, 1991], dass die Konformität der Antigene nicht irreversibel verändert worden ist. Um die antigenen Strukturen zu demaskieren, führten sie eine Inkubation der Epon-Schnitte mit einer gesättigten Lösung von meta-Periodat für 60 Minuten bei Raumtemperatur durch. Die reduzierten Osmium-Moleküle wurden dabei oxidiert, um sie anschließend auswaschen zu können [Bendayan, 1987]. Bedenkt man die Schwierigkeiten in der Erhaltung der Morphologie kryofixierter Präparate, so erscheint es sinnvoll, den Zusatz von OsO_4 zum Substitutionsmedium auszutesten, obwohl meta-Periodat den Kontrast der Ultradünnschnitte beeinträchtigen kann.

Die PLT-Methode ist der Gefriersubstitution unterlegen, denn sie resultiert in einer vergleichsweise geringeren Reaktivität der Antigene [Bittermann 1992, Schwarz 1989]. Die Ausgangsbedingungen für beide Methoden sind jedoch unterschiedlich. Bei der PLT-Methode wird chemisch fixiertes Gewebe entwässert, das von Raumtemperatur auf -30°C bis -80°C geführt werden muss. Die Gefriersubstitution hingegen geht von kryofixierten Präparaten aus, die bereits auf -90°C abgekühlt wurden. Vergleiche, die der Gefriersubstitution aus Gründen der Antigenität den Vorrang geben, schließen demnach eine Empfehlung der Kryofixierung ein. Das Senken der Temperatur während der Dehydrierung stellt einen Kompromiss dar, um chemisch fixiertes Gewebe bei tiefen Temperaturen

einbetten zu können. Die PLT-Methode ist im Vergleich zur konventionellen Dehydrierung bei Raumtemperatur von bedeutendem Vorteil, da Denaturierungs- und Extraktionsartefakte deutlich vermindert werden können [Carlemalm, 1982].

4.2.2.4 Die Einbettung

Der Einfluss der verschiedenen Einbettmedien auf den Charakter elektronenmikroskopischer Aufnahmen lässt sich anhand von Acrylat-Einbettungen demonstrieren. Die in Acrylate eingebetteten ERM verfügen beispielsweise im Vergleich zu in Epon eingebetteten ERM über eine verdickte, aufgetriebene ILM, bei der die Undulationen der retinalen Seite verstrichen sind. Das unterschiedliche Erscheinen von in Acrylat eingebettetem Gewebe verglichen mit Epon-Einbettungen ist insgesamt vermutlich auf die jeweilige Kombination von ‚Low-Temperature‘ Methoden, auf die Durchführung bzw. den Verzicht von OsO_4 -Postfixierungen, auf hydrophile bzw. hydrophobe Eigenschaften des Einbettmediums und auf eine geringere Kontrastierbarkeit der Ultradünnschnitte zurückzuführen.

Die Hydrophilität der Acrylate und die Präparation bei tiefen Temperaturen bewirken, dass die sogenannten Hydrathüllen und damit auch die biochemischen Strukturen der Epitope erhalten bleiben. Hydrathüllen stellen eine Schicht geordneter Wassermoleküle an der Oberfläche von Makromolekülen z.B. von Proteinen dar. Werden die Hydrathüllen durch chemische Lösungsmittel zerstört, ändert sich die Konformität der Makromoleküle, die ihre biologische Aktivität verlieren. Dieser Vorgang entspricht dem derzeitigen Verständnis des Denaturierungsprozesses [Kellenberger, 1991]. Hier setzen die wesentlichen Erfordernisse immunologischer Nachweisreaktionen an: Je niedriger die Temperatur, desto hydrophiler das Medium. Sogar Substanzen, die bei Raumtemperatur hydrophobe Eigenschaften besitzen, werden bei tiefen Temperaturen wasserlöslich. Und weiter: Je größer die Hydrophilität, desto höher der Schmelzpunkt dieser Hydrathüllen und mit ihnen die Temperatur, die benötigt wird, um Makromoleküle zu präzipitieren. Auf der Basis dieser chemischen Zusammenhänge wird deutlich, warum die Wahl der Temperatur eine zentrale Rolle spielt beim Aufbereiten des Gewebes für die Immunzytochemie, warum die Gefriersubstitution der konventionellen Dehydrierung sowie der PLT-Methode vorgezogen werden sollte und warum das Verfahren der ‚Low-Temperature‘ Einbettung wesentlich zum Erfolg der Kryomethoden beigetragen hat. Acrylate eignen sich auch deshalb für immunzytochemische Färbereaktionen, weil sie die Hydrathüllen erhalten, bis die Polymerisation bei tiefen Temperaturen abgeschlossen ist und das fertige Präparat auf Raumtemperatur erwärmt werden kann. Die nun schmelzenden Hydrathüllen hinterlassen eine Lücke zwischen Makromolekül und polymerisiertem Einbettungsmedium, so dass beim Erstellen der Ultradünnschnitte die Epitope der Antigenstrukturen freigelegt werden und für Antikörper zugänglich sind [Kellenberger, 1991].

Bei den bisher durchgeführten immunzytologischen Untersuchungen an ERM wurde das Gewebe in Lowicryl K4M eingebettet [Casaroli-Marano, 1999; Campochiaro, 1992]. Das neueste, kommerziell erhältliche Acrylat, das Unicryl, wurde 1992 von Scala et al. eingeführt [Scala, 1992], die bei Vergleichen mit Lowicryl K4M eine besser erhaltene Ultrastruktur demonstrierten. Andere Studien konnten zeigen, dass eine Einbettung in Unicryl, verglichen mit Lowicryl K4M, in einer signifikant stärkeren Immunreaktivität resultiert [Bogers, 1996]. In Anlehnung an die Komponenten des von Scala et al. eingeführten Bioacryls ist für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit das Medium G entwickelt worden [Scala, 1992]. In einer Reihe von Vorversuchen wurden die Bestandteile des Bioacryls in unterschiedlicher Konzentration dem kommerziell erhältlichen Unicryl gegenübergestellt. Vergleiche zu Polymerisations-, Schneide- und Färbeverhalten konnten zeigen, dass die Eigenschaften des Mediums G denen des Unicryls gleichen. Hält man sich an die Anweisungen des Herstellers, ist das Gewebe vom Substitutionsmedium direkt in 100%iges Unicryl zu bringen, um nach einer Dauer von 60 Minuten die Infiltration in neuem, reinem Unicryl über Nacht fortzusetzen. Dieses Standardeinbettungsprotokoll kann jedoch zu deutlichen morphologischen Veränderungen des Gewebes führen, wie Bogers et al. herausfanden [Bogers, 1996]. Damit wäre Unicryl der Einbettung mit Lowicryl K4M unterlegen. Durch minimale Änderungen dieses Präparationsablaufs konnte jedoch demonstriert werden, dass bei Verwendung von Unicryl die Ultrastruktur des Gewebes durch ein modifiziertes, graduelles Infiltrationsprozedere ebenso gut erhalten werden kann wie bei Verwendung von Lowicryl K4M. Diese Erfahrungen wurden für den Vorgang der Infiltration ERM umgesetzt.

4.2.2.5 Die Polymerisation

Nach den Richtlinien des Herstellers soll Unicryl bei +4°C mit UV-Licht polymerisiert werden. Dies entspricht jedoch nicht den Prinzipien einer ‚Low-Temperature‘ Einbettung und würde Unicryl im Vergleich zu anderen Acrylaten benachteiligen. Eine Polymerisation bei tiefen Temperaturen wird aber möglich, wenn man zusätzlich einen Katalysator beimischt [Newman, 1999]. Wird Unicryl bei -20°C für 4 Tage polymerisiert, schließt sich eine Aushärtungsperiode bei +4°C für die Dauer von 7 Tagen an. Zur Kühlung und Dispersion des UV-Lichtes hat sich das Platzieren der Gelatinekapseln in Ethanol oder Propanol bewährt [Bogers, 1996]. Während Polymerisationsprotokolle von Unicryl bei Temperaturen von -20°C und -50°C sehr gute ultrastrukturelle Ergebnisse gewährleisten, kann eine Temperaturerhöhung innerhalb der Präparate durch die Exothermie der Polymerisation bei Temperaturen von +4°C zu morphologischen und molekularen Gewebeschäden zu führen [Goping, 1996]. Zeichen exothermer Reaktion sind in allen Gelatinekapseln der hier beschriebenen Versuche in Form von Luftblasen am Boden bzw. Volumenschwankungen des Einbettmediums beobachtet worden sind. Sie verlangen entweder eine Senkung der Temperatur oder eine Vergrößerung des Abstands der Präparate zur Lichtquelle.

4.2.2.6 Die Kontrastierung

Sowohl Epoxy- als auch Acrylat-Ultradünnschnitte werden häufig mit Uranylazetat (UA) bei +60°C und Bleizitrat (PB) bei Raumtemperatur kontrastiert. Der Kontrast auf Abbildungen von Acrylat-Einbettungen ist jedoch um ein Vielfaches geringer als bei Epon-Schnitten. Einerseits wurde diese Tatsache auf eine bei Acrylaten vergleichsweise schlechter erhaltene Ultrastruktur [Ichikawa, 1989] und andererseits auf eine schwächere Kontrastierbarkeit zurückgeführt [Horowitz, 1992]. Der geringe Kontrast von Zellmembranen, Basalmembranen, Golgi-Komplexen, Mitochondrien und Endoplasmatischen Retikula lässt sich potentiell durch verschiedene Möglichkeiten verbessern:

- (1) durch eine Osmium-Blei-Kontrastierung [Berryman, 1990].
- (2) durch eine UA-Postfixierung des Gewebes mit nachfolgender UA-PB-Kontrastierung [Berryman, 1990].
- (3) durch eine Kaliumpermanganat-UA-PB-Kontrastierung [Sawaguchi, 2001].
- (4) durch eine Methylzellulose-UA-Kontrastierung [Roth, 1990].

Im Gegensatz zu Epon-Schnitten verfügen die Acrylate über eine geringere Elektronenstrahlstabilität. Selbst bei schonender Handhabung können qualitativ hochwertige Ultradünnschnitte während den ersten Sekunden einer elektronenmikroskopischen Auswertung zerplatzen. Um dieser Zerstörung entgegen zu wirken, können die Grids vor Gebrauch mit Formvar, bestehend aus Polyvinylformaldehyd, beschichtet werden [Reimer, 1967b]. Bei dieser Prozedur wird jedoch eine Seite der Ultradünnschnitte für späteres ‚Immuno-Gold Labeling‘ blockiert. Berryman et al. schlagen diesbezüglich vor [Berryman, 1990], die Grids erst im Anschluss an immunzytochemische Nachweisverfahren mit Formvar zu beschichten. Auf diese Weise stehen beide Seiten eines Ultradünnschnittes der Inkubation mit Immunreagenzien zur Verfügung.

4.3 Umsetzung der Ergebnisse

In Anlehnung an die Erkenntnisse der hier durchgeführten Untersuchungen und unter Berücksichtigung der Literatur werden nachfolgend die Empfehlungen für neue Präparationsprotokolle beschrieben, welche zum Erhalt der Ultrastruktur und der Antigenität beitragen könnten.

4.3.1 Protokollvorschläge für die Kryotechniken

Der erste Schritt für eine erfolgreiche Kryofixierung ERM besteht darin, entweder eine neue und geeignetere Trägersubstanz für epiretinales Gewebe zu finden oder eine routinefähige Handhabung zu entwickeln, die erlaubt, in allen durchzuführenden Präparationsschritten auf einen Träger zu verzichten. Die letzte der zwei Möglichkeiten entspricht dem Idealfall, wird

jedoch in Anbetracht der bisherigen Erfahrungen und erfolglosen Versuche nur schwer umzusetzen sein.

4.3.1.1 Die Trägersubstanz

Kryofixierung mit Trägersubstanz: Feinporiges Filterpapier ist als Träger ERM für die Kryofixierung ungeeignet. Empfehlenswert erscheint, in chirurgischem Nahtmaterial nach einem Kunststoff- oder Seidenfaden mit 0,1 mm – 0,3 mm Durchmesser zu suchen. ERM könnten in der Schlaufe eines solchen Fadens aufgenommen und mittels ‚Plunging‘ fixiert werden. Das kryofixierte Gewebe mit Fadenanteil könnte in eine vorgekühlte FT-Kapsel überführt werden und bis zur Gefriersubstitution bei Temperaturen von -90°C lagern. Auf diese Weise könnte die lichtmikroskopisch sichtbare Eiskristallbildung reduziert und die Qualität der Semi- und Ultradünnschnitte wiederhergestellt werden. Von der Methode des ‚Slam Freezing‘ müsste vorerst abgesehen werden, da die ERM mit einem Faden als Trägersubstanz ebenso wie ohne Trägersubstanz auf dem Kupferspiegel festfrieren. Des Weiteren erscheint die Gefahr der mechanischen Schädigung durch dieses Verfahren angesichts der Fragilität epiretinalen Gewebes zu groß.

Kryofixierung ohne Trägersubstanz: Eine der denkbaren Möglichkeiten auf einen Träger zu verzichten, besteht in der direkten Platzierung ERM im unteren Konus der FT-Kapseln. Anschließend könnte die FT-Kapsel mit dem enthaltenen Gewebe durch ‚Plunging‘ kryofixiert werden. Die Poren der Kapseln, die sich oberhalb des Konus befinden, sind klein, um ein Verlorengelangen des Gewebes während des Austausches von Lösungsmittel zu verhindern. Fraglich ist jedoch, ob die ERM problemlos in diesen Konus einzubringen sind. Auch muss geklärt werden, ob und von welcher Gefrierschutz-Lösung das Gewebe im Konus der FT-Kapseln umgeben werden sollte. Eine zweite Möglichkeit besteht darin, die ERM in einer Gefrierschutz-Lösung mittels ‚Slamming‘ zu fixieren. Dazu sollte auf die Oberfläche des herabfallenden Kolbens ein schmaler Ring aus Kunststoff gelegt werden, in den das Gewebe mit Hilfe einer Pipette platziert werden könnte. Dieser Ring sollte klein sein, damit die Oberflächenspannung ihn und den Tropfen, der die ERM enthält, an der metallischen Oberfläche des Kolbens haften lässt. Fraglich ist jedoch, ob das Gewebe zuverlässig in einem Tropfen, vorzugsweise in 1-Hexadecene, platziert werden kann. Fraglich ist auch, ob die Anziehungskräfte zwischen Metalloberfläche, Tropfen und Ring stark genug sind, welcher Gefrierschutz verwendet werden sollte und ob der nach dem ‚Slam Freezing‘ gefrorene Eisblock problemlos vom Kupferspiegel gelöst werden kann, um in eine FT-Kapsel eingebracht zu werden.

Grundlage für diese drei Möglichkeiten der Handhabung ERM ist ein Gefrierschutz, welcher an die Erfordernisse der jeweiligen Technik angepasst werden muss. Ohne adäquaten

Gefrierschutz sind die theoretisch dargestellten Fixierungsverfahren nicht denkbar. Die Verwendung von Saccharose und 1-Hexadecene sollte grundsätzlich beibehalten, jedoch an die einzelnen Vorschläge der Kryofixierung angepasst werden. Um ein geeignetes Prozedere festlegen zu können, müssen in Vorversuchen Zeit und Konzentration von Kryoprotektoren ausgetestet und die Ergebnisse in Form von elektronenmikroskopischen Aufnahmen miteinander verglichen werden.

4.3.1.2 Der Gefrierschutz

In Anlehnung an die PLT-Methode sollte eine graduelle Infiltration des epiretinalen Gewebes mit Saccharose erfolgen.

A. Methode des ‚Plunging‘ mit Trägersubstanz:

1. ohne Kryoprotektion
2. 40%ige Saccharose-Lösung 1 min
3. 2,3 M Saccharose-Lösung
(graduell 1,0; 1,5; 2,0; 2,3; 2,3 M je 1 min)
4. 2,3 M Saccharose-Lösung
(graduell 1,0; 1,5; 2,0; 2,3; 2,3 M je 5 min)

B. Methode des ‚Plunging‘ ohne Trägersubstanz:

1. ohne Kryoprotektion
2. 40%ige Saccharose-Lösung 1 min
3. 2,3 M Saccharose-Lösung (graduell s.o.)
4. 2,3 M Saccharose-Lösung (graduell s.o.)
- 5.

C. Methode des ‚Slam Freezing‘ mit Trägersubstanz:

1. 40%iger Saccharose-Lösung 1 min, in 1-Hexadecene
2. 2,3 M Saccharose-Lösung (graduell s.o.), in 1-Hexadecene
3. 2,3 M Saccharose-Lösung (graduell s.o.), in 1-Hexadecene

4.3.1.3 Die Gefriersubstitution

Nach den Vorversuchen für die Kryofixierung wäre empfehlenswert die verschiedenen Möglichkeiten der Gefriersubstitution gegenüber zu stellen. Dazu sollten in verschiedenen Versuchsreihen folgende Substitutionsmedien bei -90°C ausgetestet werden:

- A. Reines Azeton
- B. Azeton mit 0,05% GA
- C. Reines Methanol
- D. Methanol mit 0,5% UA

4.3.1.4 Die Einbettung und die Polymerisation

Anschließend sollte das epiretinale Gewebe nicht auf +4°C sondern nur auf –35°C stufenweise um 5°C pro Stunde angehoben werden, um anschließend eine Infiltration mit Unicryl oder Medium G bei tiefen Temperaturen durchführen zu können. Da in der Literatur widersprüchliche Angaben zur Verwendung der Katalysator gemacht werden [Newman, 1993; Gounon, 1998], sollte ebenfalls der Zusatz von Benzoinmethylether und Benzoinethylether untersucht werden:

- A. Reines Unicryl / Medium G
- B. Unicryl / Medium G mit Benzoinmethylether
(50 mg pro 10 g Medium)
- C. Unicryl / Medium G mit Benzoinethylether
(50 mg pro 10 g Medium)

Die UV-Polymerisation sollte ebenfalls bei –35°C ablaufen, für die ca. 24 bis 72 Stunden vorgesehen werden müssen mit einer anschließenden Aushärtung von zusätzlichen 4 Tagen bei +4°C.

4.3.1.5 Die Kontrastierung

Da der Kontrast auf Abbildungen von Acrylat-Einbettungen um ein Vielfaches geringer ist als bei Epoxy Harzen, sollten Versuche unternommen werden, um diesen zu verbessern. Dazu eignen sich Untersuchungen zur Kontrastierung der Ultradünnschnitte mit:

- A. Uranylazetat-Blei-Gemisch [Berryman, 1990]
- B. Kaliumpermanganat-Uranylazetat-Blei-Gemisch [Sawaguchi, 2001]
- C. Methylzellulose-Uranylazetat-Gemisch [Roth, 1990]

4.3.2 Protokollvorschläge für die chemische Präparation

4.3.2.1 Die Methode des ‚Progressive Lowering of Temperature‘

Da die PLT-Methode der konventionellen Entwässerung bei Raumtemperatur überlegen ist und eine Infiltration und Einbettung bei –35°C ermöglicht, sollte von der konventionellen Dehydrierung abgesehen werden. Die Auswahl der Substitutionsmedien minimiert sich hierbei, da Azeton für die PLT-Technik nicht verwendet werden kann. Der Gefrierpunkt von 70%igem Azeton liegt bei –27°C. Das stufenweise Absenken der Temperatur sieht für ein 70%iges Lösungsmittel aber eine Temperatur von –35°C vor [Hobot, 1989]. Wenn bei +4°C mit einer Kombination aus 2% pFA und 0,05% GA, die beibehalten werden sollte, chemisch fixiert wird, ist nur eine Substitution durch Methanol zu empfehlen. Ausgetestet werden sollte

an dieser Stelle ebenfalls die Zugabe von Uranylazetat, um membranreiche Zellorganellen besser erhalten zu können.

Reines Methanol bzw. Methanol mit 0,5% UA als Lösungsmittel

1. 30% Lösungsmittel, 0°C, 15 min
2. 50% Lösungsmittel, -20°C, 30 min
3. 70 % Lösungsmittel, -35°C, 30 min
4. 100% Lösungsmittel, -35°C, 30 min
5. 100% Lösungsmittel, -35°C, 30 min

4.3.2.2 Die Infiltration des Einbettmediums

Die Infiltration des Einbettmediums sollte stufenweise erfolgen:

1. Einbettmedium + 100% Lösungsmittel (2:1), 2x 30 min
2. Einbettmedium + 100% Lösungsmittel (1:1), 2x 30 min
3. Einbettmedium + 100% Lösungsmittel (1:2), 2x 30 min
4. Reines Einbettmedium, 2x 30 min

Um nach einer chemischen Fixierung die PLT-Methode zu umgehen, die weniger als die konventionelle Dehydrierung aber mehr als die Gefriersubstitution zu Denaturierungs- und Extraktionsartefakten führt, könnte das epiretinale Gewebe nach der Fixierung mit Aldehydkombinationen kryofixiert und danach gefriersubstituiert werden. Auch in diesem Fall sollte ein entsprechender Gefrierschutz mit Saccharose und 1-Hexadecene der Kryofixierung vorausgehen.

Die Empfehlungen für die Polymerisation und die Kontrastierung chemisch fixierter ERM entsprechen im weiteren Verlauf denen kryofixierter Präparate.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Für die Durchführung immunzytochemischer Untersuchungen in der Elektronenmikroskopie kann nicht auf konventionelle Standardverfahren der Gewebeaufbereitung epiretinaler Membranen zurückgegriffen werden, denn die chemische Fixierung mit 4% Glutaraldehyd und die Osmiumtetroxid-Postfixierung würden die Sensitivität antigener Strukturen in epiretinalen Membranen zerstören. Aus diesem Grund sind in der vorliegenden Arbeit zwei Präparationsverfahren, welche die Antigenität potentiell erhalten, durch licht- und elektronenmikroskopische Abbildungen hinsichtlich des Erhalts ihrer Ultrastruktur und Reproduzierbarkeit miteinander verglichen worden. Dafür wurde jeweils die Fixierung variiert, die Dehydrierung und Einbettung jedoch einheitlich durchgeführt. Zur Anwendung kamen eine milde chemische Fixierung in Form einer Kombination aus 2% Paraformaldehyd und 0,05% Glutaraldehyd sowie die Kryofixierung als ‚Plunging, und ‚Impact Freezing,.

Einem Kollektiv von fünfzehn Patienten mit Makula pucker wurde im Verlauf einer Pars-plana Vitrektomie epiretinales Gewebe entnommen. Das Untersuchungsmaterial wurde auf drei Versuchsreihen zu je acht Präparaten aufgeteilt. Sechzehn Präparate wurden mit jeweils einem Tropfen 40%-iger Saccharose-Lösung und 1-Hexadecene vorbehandelt und ohne Zusatz chemischer Fixierungsmedien jedoch mit Hilfe einer Trägersubstanz kryofixiert. Anschließend wurden die Präparate bei -92°C für 48 Stunden mit Azeton substituiert und bei $+4^{\circ}\text{C}$ mit Acrylaten wie Unicryl oder G-Medium infiltriert und eingebettet. Acht der Präparate wurden in Anlehnung an die standardisierte chemische Fixierung in einer modifizierten Lösung aus 2% Paraformaldehyd und 0,05% Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer über Nacht bei $+4^{\circ}\text{C}$ fixiert. Anschließend wurden sie in einer aufsteigenden Azetonreihe bei $+4^{\circ}\text{C}$ dehydriert und ebenfalls in Unicryl oder G-Medium eingebettet. Alle Präparate wurden einheitlich mittels indirektem UV-Licht bei $+4^{\circ}\text{C}$ über einen Zeitraum von 8 bis 14 Tagen polymerisiert.

Die Feinstruktur des Gewebes ist durch die Anwendung der Kryofixierung zerstört worden, so dass bei kryofixierten epiretinalen Membranen außer der ILM und der Kollagenschicht nur Zellreste definierbar waren. Zelluläre Bestandteile epiretinaler Membranen konnten jedoch durch die milde chemische Präparation zufriedenstellend erhalten werden, wie die elektronenmikroskopischen Abbildungen belegen. Einzelheiten wie Zellkerne und Nukleoli, Chromatin und Kernporen, intrazytoplasmatische Mikrofilamente oder Endoplasmatisches Retikulum erlauben bei den chemisch fixierten ERM differenzierte Beschreibungen des Gewebes.

Der Einsatz von feinporigem Filterpapier als Trägersubstanz verstärkt die Eiskristallbildung und führt zur Instabilität im Einbettmedium, so dass das Anfertigen qualitativ hochwertiger Ultradünnschnitte nicht regelhaft gewährleistet werden konnte.

Während das Protokoll der Kryofixierung nicht ohne Verbesserungen weiterempfohlen werden kann, schafft das Protokoll der milden chemischen Fixierung aus morphologischer Sicht eine vielversprechende Basis für immunzytochemische Untersuchungen und kann für nachfolgende Studien zur Verfügung gestellt werden.

Literaturverzeichnis

- Allen AW Jr, Gass JDM. Contraction of a perifoveal epiretinal membrane simulating a macular hole. *Am J Ophthalmol* 1976; 82: 684-691
- Appiah AP, Hirose T. Secondary causes of premacular fibrosis. *Ophthalmology* 1989; 96: 389-392
- d'Ardenne AJ, McGeeJO'D. Fibronectin in disease. *J Pathol* 1984; 142: 235-251
- Avery RL, Glaser BM. Inhibition of retinal pigment epithelial cell attachment by a synthetic peptide derived from the cell-binding domain of fibronectin. *Arch Ophthalmol* 1986; 104: 1220-1222
- Bachmann L, Schmitt WW. Improved cryofixation applicable to freeze etching. *Proc Nat Acad Sci USA* 1971; 68: 2149
- Bellhorn MB, Friedman AH, Wise GN, Henkind P. Ultrastructure and clinicopathologic correlation of idiopathic preretinal macular fibrosis. *Am J Ophthalmol* 1975; 79: 366- 373
- Bendayan M, Nanci A, Kan FWK. Effect of tissue processing on colloidal gold cytochemistry. *J Histochem Cytochem* 1987; 35: 983-996
- Berryman MA, Rodewald RD. An enhanced method for post-embedding immunocytochemical staining which preserves cell membranes. *J Histochem Cytochem* 1990; 38: 159-170
- Bittermann AG, Knoll G, Németh A, Plattner H. Quantitative immuno-gold labelling and ultrastructural preservation after cryofixation and after chemical fixation and cryosectioning. *Histochemistry* 1992; 97: 421-429
- Bochoton-Piallat ML, Kapetanios AD, Donati G, Redard M, Gabbiani G, Pournaras CJ. TGF- β 1, TGF- β receptor II and EG-A fibronectin expression in myofibroblast of vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 2336—2342
- Bogers JJ, Nibbeling HA, Deelder AM, van Marck EA. Quantitative and morphological aspects of Unicryl versus Lowicryl K4M embedding in immunoelectron microscopic studies. *J Histochem Cytochem* 1996; 44: 43-48
- Bornstein P. Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *J Cell Biol* 1995; 130: 503-506
- deBustros S, Rice TA, Michels RG, Thompson JT, Marcus S, Glaser BM. Vitrectomy for macular pucker. *Arch Ophthalmol* 1988a; 106: 758-760
- deBustros S, Thompson JT, Michels RG, Rice TA, Glaser BM. Vitrectomy for idiopathic epiretinal membranes causing macular pucker. *Br J Ophthalmology* 1988b; 72: 692-695
- Campochiaro PA, van Niel E, Viores SA. Immunocytochemical labeling of cells in cortical vitreous from patients with premacular hole lesions. *Arch Ophthalmol* 1992; 110: 371-377
- Campochiaro PA, Hackett SF, Viores SA, Freund J, Csaky C, LaRochelle W, et al. Platelet-derived growth factor is an autocrine growth stimulator in retinal pigmented epithelial cells. *J Cell Sci* 1994; 107: 2459-2469
- Carlemalm E, Garavito RM, Villiger W. Resin development for electron microscopy and an analysis of embedding at low temperature. *J Microsc* 1982; 126: 123

- Carron JA, Hiscott P, Sheridan CM, Magee R, Gallagher JA. Cultures human retinal pigment epithelial cells differentially express thrombospondin-1, -2, -3, and -4. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 1137-1142
- Casaroli-Marano RP, Pagan R, Vilaro S. Epithelial-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999 ; 40 : 2062-72
- Charteris DG, Hiscott P, Grierson I, Lightman SL. Proliferative vitreoretinopathy. Lymphocytes in epiretinal membranes. *Ophthalmol* 1992; 99: 1364-1367
- Charteris DG, Hiscott P, Robey HL, Gregor ZJ, Lightman SL, Grierson I. Inflammatory cells in proliferative vitreoretinopathy subretinal membranes. *Ophthalmology* 1993; 100: 43-46
- Chen YS, Hackett SF, Schoenfeld CL, Vinore MA, Vinore SA, Campochiaro PA. Localisation of vascular endothelial growth factor and its receptors to cells of vascular and avascular epiretinal membranes. *Br J Ophthalmol* 1997; 81: 919-926
- Chu P, Grunwald GB. Functional inhibition of retinal pigment epithelial cell-substrate adhesion with a monoclonal antibody against $\beta 1$ subunit of integrin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32: 1763-1769
- Clarkson JG, Green WR, Massof D. A histopathologic review of 168 cases of preretinal membrane. *Am J Ophthalmol* 1977; 84: 1-17
- Dubochet J, Adrian M, Chang JJ, Homo JC, et al. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Quart Rev Biophys* 1988; 21: 129-288
- Ehrlich HP. Wound closure: evidence of cooperation between fibroblast and collagen matrix. *Eye* 1988; 2: 149-157
- Elder HY. Cryofixation. In: *Techniques in Immunocytochemistry*. Bullock GR, Petrusz P. (eds.), Vol. 4, Academic Press, 1989, pp. 1-28
- Engvall E, Ruoslahti E, Miller EJ. Affinity of fibronectin to collagens of different genetic types and to fibrinogen. *J Exp Med* 1978; 147: 1584
- Esser P, Heimann K, Wiedemann P. Macrophages in proliferative vitreoretinopathy and proliferative diabetic retinopathy: differentiation of subpopulations. *Br J Ophthalmol* 1993; 77: 731-733
- Fernández-Morán H. Low-temperature preparation techniques for electron microscopy of biological specimens based on rapid freezing with liquid helium II. *Ann NY Acad Sci* 1960; 85: 689-713
- Fine SL. Idiopathic Preretinal Macular Fibrosis. *Int Ophthalmol Clin* 1977; 17: 183-189
- Foos RY. Vitreoretinal juncture – simple epiretinal membranes. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1974; 189: 231-250
- Gabbiani G, Herschel BJ, Ryan GB, Statkov PR, Majno G. Granulation tissue as a contractile organ: a study of structure and function. *J Exp Med* 1972; 135: 819-834
- Gabbiani G, Chaponnier C, Huttner I. Cytoplasmic filaments and gap junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing. *J Cell Biol* 1978; 76: 561-542
- Gallemore RP, Jumper JM, McCuen BW, et al. Diagnosis of vitreoretinal adhesions in macular disease with optical coherence tomographie. *Retina* 2000; 20: 115-120
- Gandorfer A, Rohleder M, Kampik A. Epiretinal pathology of vitreomacular traction syndrom. *Br J Ophthalmol* 2002; 86: 902-909

- Gartner J. Electronmicroscopic study on the fibrillar network and fibrocyte-collagen interactions in the vitreous cortex at the ora serrata of the human eyes with special regard to the role of disintegrating cells. *Exp Eye Res* 1986; 42: 21-33
- Gass JDM. *Stereoscopic atlas of macular diseases*. Mosby, St.Louis, 1987
- Gilbert C, Hiscott P, Unger W, McLeod D. Inflammation and the formation of epiretinal membranes. *Eye* 1988; 2 (Suppl): S140-S156
- Glauert AM. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. In: *Practical methods in electron microscopy*. Glauert AM (ed.), Vol. 3, Elsevier, Amsterdam, 1975
- Goping G, Kuijpers GAJ, Vinet R, Pollard HB. Comparison of LR White and Unicryl as embedding media for light and electron immunomicroscopy of chromaffin cells. *J Histochem Cytochem* 1996; 44: 289-295
- Goping G, Kuijpers GAJ, Vinet R, Pollard HB. Comparison of LR White and Unicryl as embedding media for light and electron immunomicroscopy of chromaffin cells. *J Histochem Cytochem* 1996; 44: 289-295
- Gounon P, Rolland JP. Modification of Unicryl composition for rapid polymerization at low temperature without alteration of immunocytochemical sensitivity. *Micron* 1998; 29: 293-296
- Grabner G, Boltz G, Förster O. Macrophage-like properties of human hyalocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1980; 19: 333-340
- Greven DM, Slusher MM, Weaver RG. Epiretinal membrane release and posterior vitreous detachment. *Ophthalmology* 1988; 95: 902-905
- Grierson I, Hiscott PS, Hitchins CA, McKechnie NM, White VA, McLeod D. Which cells are involved in the formation of epiretinal membranes? *Semin Ophthalmol* 1987; 2: 99-109
- Grierson I, Joseph J, Miller M, Day JE. Wound repair: the fibroblast and the inhibition of scar formation. *Eye* 1988; 2: 135-148
- Grierson J, Mazure A, Hogg P, Hiscott P, Sheridan C, Wong D. Non-vascular vitreoretinopathy: the cells and the cellular basis of contraction. *Eye* 1996; 10: 651-652
- van Harreveld A, Crowell J. Electron microscopy after rapid freezing on a metal surface and substitution fixation. *Anat Rec* 1964; 149: 381
- Harris AK, Wild P, Stopak D. Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science* 1980; 208: 177-179
- Harris AK, Stopak D, Wild P. Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature* 1981; 290: 249-251
- Hayat MA. Principles and techniques of electron microscopy. In: *Biological applications*. van Nostrand R, Vol. 1, New York, 1970
- Heegaard S. Structure of the human vitreoretinal border region. *Ophthalmologica* 1994; 208: 82-91
- Heegaard S. Morphology of the vitreoretinal border region. *Acta Ophthalmol Scand* 1997; Suppl 1-31
- Heidenkummer HP. *Vitreoretinale Membranen; Untersuchungen zu Pathogenese und Therapie*. Habilitationsschrift, Würzburg, 1992
- Heilskov TW, Massicotte SJ, Folk JC. Epiretinal macular membranes in eyes with attached posterior cortical vitreous. *Retina* 1996; 16: 279-284

- Hernandez-Verdun D, Quintana C, Masson C, Gautier T, Arnoult J. Cryofixation, cryosubstitution, cryoembedding for visualizing of nuclear ultrastructure and for immunodetection in HeLa cells. *Biol Cell* 1991; 72: 121-132
- Hikichi T, Takahashi M, Trempe CL, Schepens CL. Relationship between premacular cortical vitreous defects and idiopathic premacular fibrosis. *Retina* 1995; 15: 413-416
- Hirokawa H, Jalkh AE, Takahashi M, et al. Role of the vitreous in idiopathic preretinal macular fibrosis. *Am J Ophthalmol* 1986; 101: 166-169
- Hiscott P, Grierson I, Trombetta CJ, Rahi AHS, Marshall J, McLeod D. Retinal and epiretinal glia – an immunohistochemical study. *Br J Ophthalmol* 1984; 68: 698-707
- Hiscott PS, Grierson I, McLeod D. Natural history of fibrocellular epiretinal membranes: a quantitative, audioradiographic, and immunohistochemical study. *Br J Ophthalmol* 1985; 69: 810-823
- Hiscott PS, Unger WG, Grierson I, McLeod D. The role of inflammation in the development of epiretinal membranes. *Curr Eye Res* 1988; 7: 877-892
- Hiscott P, Waller HA, Grierson I, Butler MG, Scott DL. The extracellular matrix of reparative tissue in the vitreous: fibronectin production in proliferative diabetic retinopathy membranes. *Eye* 1993a; 7: 288-292
- Hiscott P, Sheridan C, Magee R, Grierson I. Matrix and the retinal pigment epithelium in proliferative retinal disease. *Prog Retinal Eye Res* 1999; 18: 167-190
- Hiscott P, Wong D, Grierson I. Challenges in ophthalmic pathology: the vitreoretinal membrane biopsy. *Eye* 2000; 14: 549-559
- Hiscott P, Hagan S, Heathcote L, Sheridan CM et al. Pathobiology of epiretinal and subretinal membranes: possible roles for the matricellular proteins thrombospondin 1 and osteonectin (SPARC). *Eye* 2002; 16: 393-403
- Hobot JA. Lowicryl and low temperature embedding for colloidal gold methods. In: *Colloidal gold: principles, methods and applications*. Hayat MA (ed.), San Diego, Academic Press, 1989, pp. 75-115
- Horowitz RA, Giannasca PJ, Woodcock CL. Ultrastructural preservation of nuclei and chromatin: improvement with low-temperature methods. *J Microsc* 1990; 157: 205-224
- Humbel B, Marti T, Müller M. Improved structural preservation by combining freeze substitution and low temperature embedding. In: *Beitr Elektronenmikroskop*. Pfefferkorn G (ed.), Vol. 16, Direktabb Oberfl., Antwerpen, 1983
- Humbel BM, Schwarz H. Freeze-substitution for immunocytochemistry. In: *Immuno-gold labeling in cell biology*. Verkleij AJ und Leunissen JLM (eds.), CRC Press Inc., Boca Raton, Florida 1989, pp. 116-134
- Hunziker EB, Herrmann W, Schenk RK, Müller M, Moor H. Cartilage ultrastructure after high pressure freezing, freeze substitution, and low temperature embedding. *J Cell Biol* 1984; 98: 267-276
- Hunziker EB, Herrmann W. In situ localization of cartilage extracellular matrix components by immunoelectron microscopy after cytochemical tissue processing. *J Histochem Cytochem* 1987; 35: 647-655

- Ichikawa M, Sasaki K, Ichikawa A. Immunocytochemical localization of amylase in gerbil salivary gland acinar cells processed by rapid freezing and freeze-substitution fixation. *J Histochem Cytochem* 1989; 37: 185-194
- Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblast and during wound repair. *Mol Biol Cell* 1993; 4: 637-645
- Iwanoff A. Beiträge zu normalen und pathologischen Anatomie des Auges. *Archiv f Ophthalmol* 1865; 11: 135-170
- Jaffe NS. Macular retinopathy after separation of vitreoretinal adherence. *Arch Ophthalmol* 1967; 78: 585-591
- Jahn CE, Minich V, Moldaschel S, Stahl B et al. Epiretinal membranes after extracapsular cataract surgery. *J Cataract Refract Surg* 2001; 27: 753-760
- Jerdan JA, Kao L, Glaser BM. The inner limiting membrane – A modified basement membrane? ARVO abstracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27 (Suppl):230
- Jiang de Y, Hiscott PS, Grierson I, Hitchens CA, McLeod D. Growth and contractility of cells from fibrocellular epiretinal membranes in primary tissue culture. *Br J Ophthalmol* 1988; 72: 116-126
- Johnston PV, Roots BI. Fixation of the central nervous system by perfusion with aldehydes and its effect on the extracellular space as seen by electron microscopy. *J Cell Sci* 1967; 2: 377
- Kampik A, Kenyon KR, Michels RG, Green WR, de la Cruz ZC. Epiretinal and vitreous membranes. *Arch Ophthalmol* 1981a; 99: 1445-1454
- Kampik A. *Epiretinale und vitreale Membranen*. Habilitationsschrift, München, 1981b
- Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 1967; 27: 137A
- Kellenberger E. The potential of cryofixation and freeze substitution: observations and theoretical considerations. *J Microsc* 1991; 161: 183-203
- Kellenberger E, Johansen R, Maeder M. Artefacts and morphological changes during chemical fixation. *J Microsc* 1992; 168: 181-201
- Klein R, Klein BEK, Wang Q, Moss SE. The epidemiology of epiretinal membranes. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1994; XCII: 403-430
- Kohno T, Sorgente N, Ishibashi T, Goodnight R, Ryan SJ. Immunofluorescent studies of fibronectin and laminin in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28: 506-514
- Lawler J. The functions of thrombospondin-1 and -2. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 503-506
- van Lookeren Campagne M, Oestreicher AB, van der Krift TP, Gispen WH, Verkleij AJ. Freeze-substitution and Lowicryl HM20 embedding of fixed rat brain: suitability for immunogold ultrastructural localization of neural antigens. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 1267-1279
- Machemer R. Die chirurgische Entfernung von epiretinalen Makulamembranen (macular pucker). *Klin Mbl Augenheilk* 1978a; 172: 36-42
- Machemer R, vanHorn D, Aaberg TM. Pigment epithelial proliferation in human retinal detachment with massive preretinal proliferation. *Ophthalmology* 1978b; 85: 181-191

- Magee RM, Hagan S, Hiscott P, Carron JA, Sheridan CM, McGalliard J, Grierson. Synthesis and secretion of osteonectin (SPARC) by human retinal pigment epithelial cells is modulated by cell density. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 2707-2711
- Margherio RR, Cox MS, Trese MT, Murphy LP, Johnson J, Minor LA. Removal of epimacular membranes. *Ophthalmology* 1985; 92: 1075-1083
- Marshall GE, Konstas AGP, Lee WR. Collagens in ocular tissue. *Br J Ophthalmol* 1993;77:515-524
- McLeod D, Hiscott PS, Grierson I. Age-related cellular proliferation at the vitreoretinal juncture. *Eye* 1987; 1: 263-281
- Meyer P, Wunderlich K, Kain HL, Prünke C, Flammer J. Human connective tissue growth factor mRNA expression of epiretinal and subretinal fibrovascular membranes: a report of three cases. *Ophthalmologica* 2002; 216: 284-291
- Messner KH. Spontaneous separation of preretinal macular fibrosis. *Am J Ophthalmol* 1977; 83: 9-11
- Michels RG. Vitreous surgery for macular pucker. *Am J Ophthalmol* 1981; 92: 628-639
- Migheli A, Attanasio A, Schiffer D. LR Gold embedding of nervous tissue for immunoelectron microscopy studies. *Histochemistry* 1992; 97: 413-419
- Millonig G, Marinozzi V. Fixation and embedding in electron microscopy. In: *Advances in optical and electron microscopy*. Barer R, Cosslett VE (eds.), Vol. 2, Academic Press, New York, 1968
- Müller M, Meister N, Moor H. Freezing in a propane jet and its application in freeze-fracturing. *Mikroskopie* 1980; 36: 129
- Murphy-Ullrich JE. The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *J Clin Invest* 2001; 107: 785-790
- Newman GR. LR White embedding medium for colloidal gold methods. In: *Colloidal gold: principles, methods and applications*. Hayat MA (ed.), San Diego, Academic Press, 1989, pp. 47-73
- Newman GR, Hobot JA. Role of tissue processing in colloidal gold methods. In: *Colloidal gold: principles, methods and applications*. Hayat MA (ed.), San Diego, Academic Press, 1993, pp. 33-45
- Newman GR, Hobot JA. Resins for combined light and electron microscopy: a half century of development. *Histochem J* 1999; 31: 495-505
- Noble KG, Carr RE. Idiopathic preretinal gliosis. *Ophthalmology* 1982; 89: 521-523
- Palade GE. A study of fixation for electron microscopy. *J Exp Med* 1952; 95: 285
- Parsons JH. *The pathology of the eye*. Vol.2, Hodder and Stoughten, London, 1905, pp. 542-600
- Quintana C. Cryofixation, cryosubstitution, cryoembedding for ultrastructural, immunocytochemical and microanalytical studies. *Micron* 1994; 25: 63-99
- Rall WF, Fathy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -197°C by vitrification. *Nature (Lond)* 1985; 313: 573-575
- Reimer L. Gewebefixierung. In: *Elektronenmikroskopische Untersuchungs- und Präparationsmethoden*. Reimer L (ed.), Springer-Verlag, Berlin, 1967a, pp. 410-449
- Reimer L. Herstellung und Eigenschaften von Trägerfolien. In: *Elektronenmikroskopische Untersuchungs- und Präparationsmethoden*. Reimer L (ed.), Springer-Verlag, Berlin, 1967b, pp. 320-330

- Roth AM, Foos RY. Surface wrinkling retinopathy in eyes enucleated at autopsy. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1971; 75: 1047-1058
- Roth J, Taatjes DJ, Tokuyasu KT. Contrasting of Lowicryl K4M thin sections. *Histochem* 1990;95: 123-136
- Sabatini DD, Bensch K, Barnett RJ. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzyme activity by aldehyde fixation. *J Cell Biol* 1963; 17: 19
- Sawaguchi A, Ide S, Goto Y, Kawano JI, Oinuma T, Sukanuma T. A simple contrast enhancement by potassium permanganate oxidation for Lowicryl K4M ultrathin sections prepared by high pressure freezing/Freeze substitution. *J Microscopy* 2001; 201: 77-83
- Scala C, Cenacchi G, Ferrari C, Pasquinelli G, Preda P, Manara GC. A new acrylic resin formulation: a useful tool for histological, ultrastructural, and immunocytochemical investigations. *J Histochem Cytochem* 1992; 40: 1799-1804
- Schneeberger SA, Hjelmeland LM, Tucker RP, Morse LS. Vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor 5 are colocalized in vascular and avascular epiretinal membranes. *Am J Ophthalmol* 1997; 124: 447-454
- Schwarz H, Humbel BM. Influence of fixatives and embedding media on immunolabelling of freeze-substituted cells. *Scanning Microsc* 1989; 3 (Suppl.): 57-64
- Schwartz SD, Alexander R, Hiscott P, Gregor ZJ. Recognition of vitreoschisis in proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 1996; 103: 323-328
- Scott JE. The chemical morphology of the vitreous. *Eye* 1992; 6: 553-555
- Sebag J. Age-related differences in the human vitreoretinal interface. *Arch Ophthalmol* 1991; 109: 966-971
- Sheridan CM, Hiscott P, Grierson I. The role of thrombospondin 1 in RPE migration and in human RPE induced collagen matrix contraction. (ARVO Abstract). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: S811. Abstract 4348
- Sidd RJ, Fine SL, Owens SL, Patz A. Idiopathic preretinal gliosis. *Am J Ophthalmol* 1982; 94: 44-48
- Sitte H, Neumann K, Edelmann L. Cryosectioning according to Tokuyasu vs. rapid freezing, freeze-substitution and resin embedding. In: *Immuno-gold labeling in cell biology*. Verkleij AJ und Leunissen JLM (eds.), CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1989, pp. 64-94
- Spitznas M, Lenzenberger R. Die primäre epiretinale Gliose. *Klin Mbl Augenheilk* 1977; 171: 410
- Stein O, Stein Y. Light and electron microscopic radioautography of lipids: technique and biological applications. *Adv Lipid Res* 1971; 9: 1
- Tannenbaum HL, Schepens CL, Ilzeneiny I. Macular pucker following retinal detachment surgery. *Arch Ophthalmol* 1979; 83:286-293
- Tokuyasu KT. A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. *J Cell Biol* 1973 ; 57: 551-565
- Tormey J. Artifactual localization of ferritin in the ciliary epithelium in vitro. *J Cell Biol* 1965; 25: 1
- Tsukamoto Y, Hessel WE, Wahl SM. Macrophage production of fibronectin, a chemoattractant for fibroblasts. *J Immunol* 1981; 127: 673-678
- Vinorez SA, Campochiaro PA, Conway BP. Ultrastructural and electron-immunocytochemical characterization of cell in epiretinal membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990a; 31: 14-28

- Vinores SA, Campochiaro PA, McGehee R, Orman W, Hackett SF, Hjelmeland LM. Ultrastructural and immunocytochemical changes in retinal pigment epithelium, retinal glia, and fibroblasts in vitreous culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990b; 31: 2529-2545
- Vinores SA, van Niel E, Kim HJ, Campochiaro PA. Simultaneous expression of keratin and glial fibrillary acidic protein by the same cells in epiretinal membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33: 3361-3366
- Weibull C, Villiger W, Carlemalm E. Extraction of lipids during freeze-substitution of *Acholeplasma laidlawii*-cells for electron microscopy. *J Microsc* 1984; 134: 213
- Weller M, Wiedemann P, Bresgen M, Heimann K. Vitronectin and proliferative intraocular disorders. *Int Ophthalmol* 1991; 15: 93-101
- Wilson MT, Farmer MA, Karwoski CJ. Ultrastructure of frog retina after high-pressure freezing and freeze substitution. *J Microsc* 1998; 189: 219-235
- Wise GN. Clinical features of idiopathic preretinal macular fibrosis. Schoenberg Lecture. *Am J Ophthalmol* 1975a; 79:349-357
- Wise GN. Relationship of idiopathic preretinal macular fibrosis to posterior vitreous detachment. *Am J Ophthalmol* 1975b; 79: 358-362
- Zhang YX, Wang JH, Bian HW, Zhu MY. (2001) Pregrowth-desiccation: a simple and efficient procedure for the cryopreservation of rice embryonic suspension cells. *CryoLetters*; 22: 221-228

Liste der Abkürzungen

CTGF	Connective tissue growth factor
ERM	Epiretinale Membranen
EZM	Extrazelluläre Matrix
FGF	Fibroblast growth factor
FN	Fibronectin
GA	Glutaraldehyd
GFAP	Glial fibrillare acidic protein
IF	Intermediärfilament
IL	Interleukin
ILM	Inner limiting membrane
OsO ₄	Osmiumtetroxid
PB	Bleizitrat
pFA	para-Formaldehyd
PDGF	Platelet-derived growth factor
PLT	Progressive Lowering of Temperature
PVR	Proliferative Vitreoretinopathie
RPE	Retinales Pigmentepithel
SPARC	Secreted protein acidic & rich in cysteine
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
TSP	Thrombospondin
UA	Uranylazetat
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Anselm Kampik für das wissenschaftliche Umfeld, in dem diese Arbeit entstanden ist, sowie für die Bereitstellung des Untersuchungsmaterials.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Arnd Gandorfer. Sein Vertrauen und seine uneingeschränkte Unterstützung machten die vorliegende Arbeit möglich. Er stand mir jederzeit mit hilfreichen Hinweisen, wissenschaftlichem Weitblick und motivierender Zuversicht zur Seite.

Herrn Jürgen Werner danke ich herzlich für die freundschaftliche Zusammenarbeit im Labor, für sein stetes Engagement sowie für die unzähligen, bereichernden Diskussionen und Anregungen zur Aufbereitung der Präparate.

Herrn Matthias Rohleder möchte ich für die kooperative Einarbeitung am Transmissionselektronenmikroskop danken.

Frau Merz, Frau Lengersdorff und Herrn Kröhn sei für ihre bereitwillige Unterstützung bei der Aufarbeitung der licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen gedankt.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Großeltern für ihre Ermutigungen, ihre Geduld und liebevolle Unterstützung. Durch sie war ich den Herausforderungen dieser Arbeit gewachsen.

Lebenslauf

- 1977 geboren in Altdöbern als zweites Kind des Diplom-Chemikers und Fachingenieurs für Grundwasserwirtschaft Heinz Schumann und der Studienrätin Sabine Schumann, geborene Näther, sowie als Schwester von Dr. med. Romy Schumann, Internistin
- 1984 Einschulung in die Grundschule Hosena
- 1991 Übertritt in das naturwissenschaftliche Gymnasium Senftenberg
- 1997 Abitur und Beginn des Medizinstudiums an der Universität Leipzig
- 1998 Hochschulwechsel an die Ludwig-Maximilians-Universität München
- 1999 Ärztliche Vorprüfung
- 2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 2003 Praktisches Jahr an der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, dem Massachusetts General Hospital der Harvard Medical School in Boston und dem Hôpital Cantonal der Universität Genf
- 2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung