

Validierung von OCT-Befunden
am hinteren Augensegment von Greifvögeln
mittels Konfokalmikroskopie

von Elisabeth Hagen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Validierung von OCT-Befunden
am hinteren Augensegment von Greifvögeln
mittels Konfokalmikroskopie**

von Elisabeth Hagen

aus Rostock

München 2020

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Aviäre Medizin und Chirurgie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Korbel

Mitbetreuung durch
Dr. Regina Sigg

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Korbel

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Tag der Promotion: 08.02.2020

„... the eyes of birds are supreme amongst all living creatures.“

- Duke-Elder, 1958



INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Das hintere Augensegment des Vogelauges.....	3
2.1.1	Retina.....	3
2.1.2	Pecten oculi.....	8
2.1.3	Nervus opticus.....	10
2.2	Die optische Kohärenztomographie (OCT).....	11
2.2.1	Einführung	11
2.2.2	Technische Grundlagen.....	11
2.2.3	Einsatzgebiete	14
2.2.4	Interpretation von aviären retinalen Tomogrammen.....	16
2.2.5	Darstellung pathologischer Veränderungen am Greifvogelfundus	18
2.3	Die Konfokalmikroskopie (CLSM)	20
2.3.1	Einführung	20
2.3.2	Prinzip der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie	20
2.3.3	Vorteile gegenüber der konventionellen Mikroskopie	22
2.3.4	Grundlagen der Immunhistochemie	23
2.3.5	Einsatzgebiete	25
2.4	Histologische Präparation des Auges	26
2.4.1	Enukleation.....	26
2.4.2	Fixation.....	27
III.	MATERIAL UND METHODEN	30
3.1.	Patientengut.....	30
3.1.1	Klinische Allgemeinuntersuchung	32
3.1.2	Ophthalmologische Untersuchung	32
3.2	OCT-Untersuchung.....	34
3.2.1	Das Gerät.....	34
3.2.2	Vorbereitungen.....	36
3.2.3	Aufnahme	37
3.2.4	Auswertung	38
3.3	Histologische Untersuchung	41
3.3.1	Euthanasie	41

3.3.2	Entnahme der Bulbi	42
3.3.3	Fixation der Retina	42
3.3.4	Kalottierung	43
3.3.5	Vorbereitung der Probe	44
3.3.6	Markierung mit Antikörpern.....	46
3.3.7	Konfokalmikroskopische Aufnahme	48
3.3.8	Auswertung	48
3.4	Fotografische Dokumentation	50
IV.	ERGEBNISSE.....	51
4.1	Fixationsmethode	51
4.2	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung	53
4.3	Untersuchung mittels OCT	56
4.3.1	Reproduzierbarkeit	56
4.3.2	Folgeuntersuchungen – Fallbeispiele	58
4.3.3	Weitere pathologische Befunde	66
4.4	OCT vs. CLSM.....	69
4.4.1	Darstellung der physiologischen Retinaschichten	69
4.4.2	Artefakte	74
4.4.3	Vergleichende Messungen	76
4.4.4	Darstellung von pathologischen Prozessen	82
V.	DISKUSSION	91
5.1	Material- und Methodenteil	91
5.1.1	Patientengut und OCT-Untersuchung.....	91
5.1.2	Enukleation und Fixation der Retina	93
5.1.3	Anwendung der Immunhistochemie für die aviäre Retina	95
5.2	Ergebnisteil	96
5.2.1	Differenzierung der Retinaschichten	96
5.2.2	Validierung der OCT mittels CLSM	99
5.2.3	Pathologische Befunde und Folgeuntersuchungen in der OCT.....	101
5.2.4	Interpretation pathologischer Befunde in der CLSM.....	103
5.3	Schlussbeurteilung	104
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	106
VII.	SUMMARY.....	108

VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	110
IX.	ANHANG.....	125
9.1.	Befundbogen Augenuntersuchung.....	125
9.2	Messwerte	127
9.3	Abbildungsverzeichnis	130
9.4	Tabellenverzeichnis.....	133
X.	DANKSAGUNG	134

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABC	(Strepta-)Avidin-Biotin-Komplex
AK	Antikörper
A-Scans	Amplituden-Scan
B-Mode	Brightness-Modulation
B-Scan	Querschnitt-Scan
C	Choroid
CLSM	konfokale Laser Scanning Mikroskopie
CS	Cartilaginous Sclera
CSI	Choroid-Skleral-Interface
CV	Variationskoeffizient
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOS	normal Donkey Serum
DSU	Disk Spinning Unit
ELM	External Limiting Membrane
F.c.	Fovea centralis
F.t.	Fovea temporalis
FD	Fourier-Domain
GCL	Ganglion Cell Layer
HCl	Salzsäure
HEYEX	Heidelberg Eye Explorer
IF	Immunfluoreszenz
INL	Inner Nuclear Layer
IPL	Inner Plexiform Layer
IS	Inner Segment
KM	Körpermasse
LoA	Limits of Agreement
OCT	Optische Kohärenztomographie
OD	Oculus dexter
ONL	Outer Nuclear Layer
OPL	Outer Plexiform Layer
OS	Oculus sinister, Outer Segment
PBS	Phosphat-gepufferte-Salzlösung
PNA	Peanut Agglutinin
RNFL	Retinal Nerve Fiber Layer
RPE	Retinal Pigment Epithelium
SD	Standardabweichung, Spectral Domain
SDCM	Spinning-Disk-konfokale-Mikroskopie
SLD	Superlumineszenzdiode
TD	Time-Domain
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser

I. EINLEITUNG

Das Auge der Vögel weist einen hohen Spezialisierungsgrad auf und ist für die Klasse Aves von allen Sinnesorganen das Wichtigste. Ein uneingeschränkter Visus ist in Abhängigkeit vom jeweiligen Lebensraum (Ziervögel in menschlicher Obhut und Wildvögel in freier Wildbahn) essenziell für eine erfolgreiche Nahrungssuche, die Fortpflanzungsaktivität und Reproduktion, die Ausübung sozialer Kontakte und schlussendlich für die Fähigkeit zu Fliegen. Der Visus entscheidet über das Überleben in der freien Wildbahn (KORBEL, 1994; REESE et al., 2009). Auch partielle Beeinträchtigungen der Sehkraft können von anderen Sinnesleistungen nur in sehr beschränktem Maße bis gar nicht kompensiert werden (KORBEL, 1994; REESE et al., 2009). Ziervögel können zwar durchaus mit hochgradigen Einschränkungen des Visus in einer gewohnten Umgebung zureckkommen, bei Wildvögeln stellt jedoch bereits eine partielle Visuseinschränkung oder gar vollständige Blindheit eine infauste Prognose dar. Gerade für Greifvögel ist das räumliche Sehen (Stereopsis) für den Beutefang von großer Wichtigkeit (KORBEL, 1994; DAVIDSON, 1997). Der Sehsinn ist eines der primären Kriterien für die Rehabilitation (SERUCA et al., 2012). Durch die anatomischen Gegebenheiten, wie beispielsweise die verhältnismäßig großen Augen, die häufig straffe Fixierung der Bulbi in der Orbita und bei Greifvögeln deren frontale Ausrichtung, ist das Vogelauge besonders exponiert und anfällig für Erkrankungen durch Traumata. 90 % aller Augenläsionen liegt eine traumatische Ursache zugrunde und mehr als 30 % der Traumapatienten weisen okulare Veränderungen auf (MURPHY et al., 1982; KORBEL, 1994; DAVIDSON, 1997; KORBEL, 2002; REESE et al., 2009; SERUCA et al., 2012; MOORE et al., 2017). Stumpfe Traumata führen häufiger zu Läsionen bzw. Blutungen am Augenhintergrund als im vorderen Augensegment (MURPHY et al., 1982; REESE et al., 2009; MOORE et al., 2017). Läsionen der inneren Strukturen sind äußerlich nicht sichtbar und typischerweise nicht schmerhaft (DAVIDSON, 1997; REESE et al., 2009). Sie sind oftmals gravierender als Verletzungen im vorderen Abschnitt des Auges und dadurch entscheidend (SERUCA et al., 2012). Eine genaue und gründliche ophthalmologische Untersuchung, besonders des Augenhintergrunds, ist somit bei Traumapatienten in jedem Fall obligatorisch (KORBEL, 1994). Eine in der Humanmedizin längst eingesetzte Methode für die Erkennung von Veränderungen am hinteren Augensegment ist die optische Kohärenztomographie – OCT. Sie gilt als

Goldstandard zur Erkennung von Retinopathien (AZMANIS et al., 2012; KORBEL et al., 2012). Die Einsetzbarkeit für die aviäre Augenheilkunde wurde das erste Mal 1998 in der Studie von HUANG et al. (1998) bei Hühnern erprobt und erwies sich als nützliches diagnostisches Werkzeug. Seitdem häufen sich Studien zu Untersuchungen an Vogelaugen mittels OCT. Validierungen zur Anwendung des für den Menschen entwickelten bildgebenden Verfahrens an Tieren, lassen sich jedoch kaum finden. Die meisten Studien ziehen lediglich qualitative Vergleiche zwischen den Aufnahmen der OCT und der Histologie (Y. HUANG et al., 1998; RAUSCHER et al., 2013; BERGER et al., 2014; GIANNAKAKI-ZIMMERMANN et al., 2016).

Das Ziel der Dissertation ist es, eine quantitative Validierung der OCT für den Einsatz bei Vögeln durchzuführen. Dabei findet ein Vergleich mit dem Goldstandard der Histologie statt, der Konfokalmikroskopie. Durch die Validierung soll der diagnostische Wert und die Aussagekraft der OCT in der aviären Augenheilkunde bestimmt werden. Sämtliche Untersuchungen wurden im Tierversuchsantrag 55.2-1-54-2532-46-2015 durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

II. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Das hintere Augensegment des Vogelauges

2.1.1 Retina

DUKE-ELDER erkannte schon 1958, dass die Augen der Vögel mit wenigen Ausnahmen, wie die des Kiwis, abhängig vom Lebensraum einen hohen Spezialisierungsgrad aufweisen. Zwar zeigt die Retina denselben Grundaufbau wie alle Vertebraten, doch die Klarheit und Strukturierung einzelner Schichten ist einzigartig (WALLS, 1942).

In ihrem histologischen Aufbau lässt sich die Netzhaut in einen vorderen blinden und lichtunempfindlichen Abschnitt ohne Rezeptoren unterteilen – die **Pars caeca retinae** – und einen hinteren lichtempfindlichen, rezeptorreichen Teil – die **Pars optica retinae**. Beide Anteile werden durch eine Grenzlinie, die sogenannte Ora serrata getrennt und sind an der Austrittsstelle des Sehnervs (Discus nervi optici) miteinander verwachsen (HEES und SINOWATZ, 1992; KÖNIG und LIEBICH, 2009; REESE et al., 2009). Die Pars optica retinae selbst wird in zwei weitere Blätter unterteilt: Der äußeren Pigmentschicht (Stratum pigmentosum retinae) und der inneren Nervenschicht (Stratum nervosum retinae) (REESE et al., 2009).

Die Zellen des **Stratum pigmentosum retinae** enthalten lichtabsorbierende Melaningranula, mit deren Hilfe störende Reflexe und Sehunschärfen im Auge verhindert werden (KORBEL, 1994). Zahlreiche Melaningranula und damit einhergehend eine starke Pigmentierung der Retina weisen tagaktive Vögel auf, bei denen der Augenhintergrund (Fundus oculi) bei der ophthalmologischen Untersuchung entsprechend dunkel erscheint. Der Fundus stellt sich in einer typisch braunen, braun-rötlichen oder grauen Farbe dar. Ein sogenannter tigroider Fundus findet sich bei dämmerungs- und nachtaktiven Vögeln (REESE et al., 2009). Durch die geringe Anzahl an Melaningranula und der schwachen retinalen Pigmentierung, kommt es zum Durchscheinen der darunterliegenden choroidalen Gefäße. Dem Fundus wird ein gestreiftes Aussehen verliehen, wie in Abbildung 1, Seite 4 zu sehen ist und wird aus diesem Grund als tigroid bezeichnet (DUKE-ELDER, 1976; REESE et al., 2009).

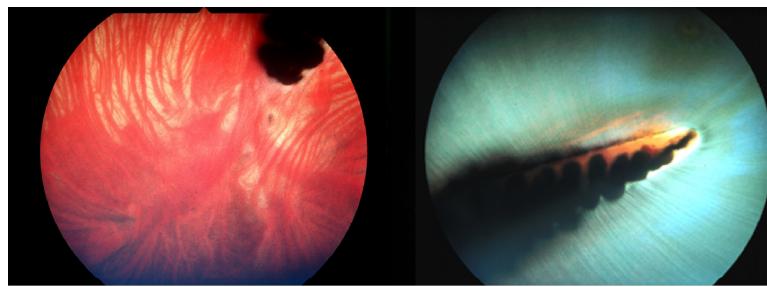


Abbildung 1: Links: Tigroider Fundus (OS) eines nachaktiven Virginia-Uhus (*Bubo virginianus*); Rechts: Fundus (OS) eines tagaktiven Weißkopfseeadlers (*Haliaeetus leucocephalus*)

mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. R. Korbel

Die Intensität der Pigmentierung variiert speziesspezifisch und individuell sehr stark. Zudem korreliert sie mit der Gefiederpigmentierung (REESE et al., 2009).

Das **Stratum nervosum** besteht, wie bei allen Wirbeltieren, aus drei hintereinander geschalteten Neuronennetzwerken (MEYER, 1986; HEES und SINOWATZ, 1992; REESE et al., 2009). Dabei lassen sich unterschiedliche Grundtypen unterscheiden: Fotorezeptoren, Bipolar-, Horizontal-, Amakrin- und Ganglienzellen. Der einzige vorkommende Gliatyp der Retina ist die Müllergliazelle (MEYER, 1986; HEES und SINOWATZ, 1992). Bei der Organisation der genannten Zellen ist histologisch eine deutliche Schichtung erkennbar, wie in Abbildung 2 dargestellt:

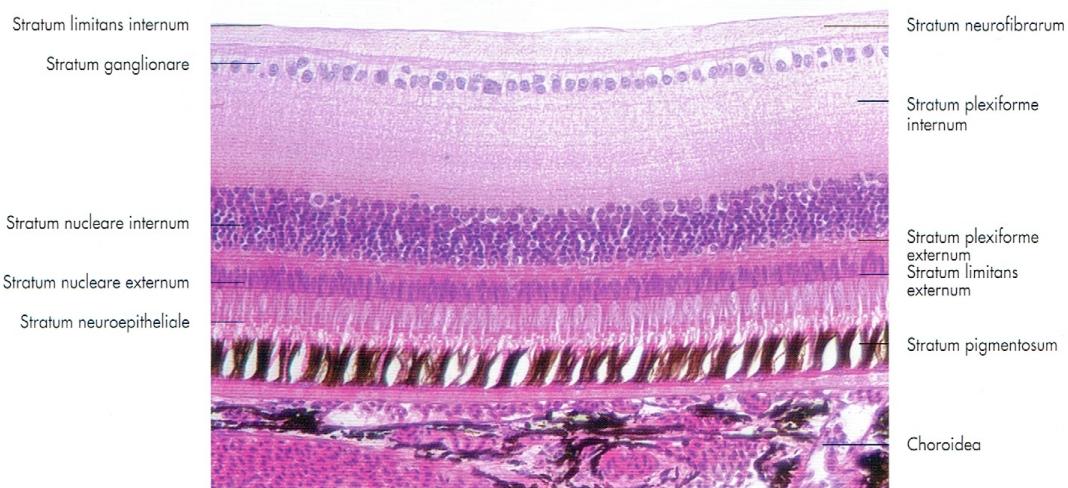


Abbildung 2: Retinale Schichtung der Pars optica retinae eines Haushuhnes (*Gallus gallus domesticus*)

aus König et al. (2008)

Das **Neuroepithel (Stratum neuroepitheliale)** wird von den Außensegmenten der Fotorezeptoren gebildet, die dem Pigmentepithel zugewandt sind. Die

äußere Kernschicht (Stratum nucleare externum) beherbergt die Zellkerne der Fotorezeptoren. Deren Fortsätze und synaptische Verbindungen zu den Horizontal- und Bipolarzellen stellen die **äußere plexiforme Schicht (Stratum plexiforme externum)** dar (HEES und SINOWATZ, 1992). In der **inneren Kernschicht (Stratum nucleare internum)** sind die Somata der Horizontal-, Bipolar-, Amakrin- und Müllergliazellen vorzufinden. Die synaptischen Verschaltungen mit den Fortsätzen der Ganglienzellen, finden sich in der **inneren plexiformen Schicht (Stratum plexiforme internum)** wieder (WALLS, 1942; HEES und SINOWATZ, 1992; KÖNIG und LIEBICH, 2009). Die Kerne der Ganglienzellen bilden die **Ganglienzellschicht (Stratum ganglionare)**, deren Axone in der **Nervenfaserschicht (Stratum neurofibrarum)** zusammenlaufen und das Auge als Nervus opticus verlassen. Die umliegenden **Grenzmembranen (Stratum limitans internum & externum)** werden von den Müllergliazellen gebildet. Diese erstrecken sich mit ihren Fortsätzen über die gesamte Retina und besitzen stützende, sowie nährende Funktion (HEES und SINOWATZ, 1992; KÖNIG und LIEBICH, 2009). Die Gesamtdicke der Retina ist bis zu zweimal höher als bei anderen Vertebraten (SLONAKER, 1918; WALLS, 1942; DUKE-ELDER, 1976). Die **Stäbchen- und Zapfenzellen** des Stratum nervosum bilden zusammen die fotosensible Schicht der Netzhaut. Die Stäbchenzellen sind mit ihrer langen, schmalen Erscheinung für das Dämmerungs- und Nachtsehen (skotopisches Sehen) verantwortlich, wohingegen die konischen Zapfenzellen das Tag- und Farbsehen (photopisches Sehen) ermöglichen (HEES und SINOWATZ, 1992; KÖNIG und LIEBICH, 2009; REESE et al., 2009). Dementsprechend dominieren bei den nachtaktiven Vögeln die Stäbchenzellen und die Zapfen bei den Tagaktiven (WALLS, 1942; KING und MCLELLAND, 1984; REESE et al., 2009). Die Zapfenzellen kommen als sogenannte Doppel- oder Zwillingszapfen vor, wie bei fast allen Wirbeltieren. Dabei handelt es sich um zwei unabhängige, aber eng miteinander verbundene Rezeptorzellen, deren Bedeutung noch nicht eindeutig geklärt ist (MEYER, 1986). Ein charakteristisches aviäres Merkmal sind eingelagerte Öltropfen in den Zapfen, bei denen es sich um karotinoide Pigmente handelt. (DUKE-ELDER, 1976; MEYER, 1986). Die karotinoiden Pigmente üben durch unterschiedliche Absorptionsmaxima eine chromatische Filterfunktion aus (REESE et al., 2009).

Verdickte Bereiche der Retina mit einer auffallend dichten Anordnung von Zapfenzellen und einem hohen Auflösungsvermögen werden als **Areae retinae** bezeichnet (REESE et al., 2009). Diese kommen bei allen Vertebraten vor und werden beim Menschen durch eine charakteristische Gelbfärbung auch als

Macula oder gelber Fleck bezeichnet (WOOD, 1917; KÖNIG und LIEBICH, 2009). Die erhabene Area trägt zur Sehschärfe bei und kann ein Verhältnis von 1:1 zwischen Rezeptor- und Nervenzelle erreichen (PUMPHREY, 1948; REESE et al., 2009). Für eine weitere Verstärkung der Sehschärfe werden peripher die im Lichtweg liegenden Neuronen verdrängt und die Region zentral eingedellt. Es entsteht eine fotorezeptorenreiche Grube, die sogenannte **Fovea retinae** (REESE et al., 2009). Eine ähnliche, aber flachere Struktur findet sich bei den Säugetieren nur unter den Primaten (WALLS, 1942; KING und MCLELLAND, 1984). Zentral der Sehgrube sind bis auf wenige Ausnahmen (Eulen) ausschließlich Zapfen zu finden. Die Stäbchen fehlen in diesem Bereich (KAJIKAWA, 1923; PUMPHREY, 1948; DUKE-ELDER, 1976). Der Mäusebussard (*Buteo buteo*) kann so eine foveale Dichte von 1 000 000 Zapfen pro mm² erreichen. Der Mensch hingegen weist schätzungsweise nur 200 000 pro mm² auf (DUKE-ELDER, 1958 zitiert nach ROCHON-DUVIGNEAUD, 1943). Die foveale Sehschärfe einiger Bussarde und Adler kann nach WALLS (1942) sogar um ein achtfaches höher sein als beim Menschen. Die große Anzahl visueller Zellen innerhalb der Fovea, verschafft ihr die Bezeichnung als „Ort des schärfsten Sehens“ (HEES und SINOWATZ, 1992). Zur Sehgrube hin findet eine Reduktion der Retinaschichten statt. Diese Reduzierung kann sehr unterschiedlich ausgeprägt sein. Meist werden die innere plexiforme Schicht, sowie die innere und äußere Kernschicht zum Zentrum hin schmäler (SLONAKER, 1918; KAJIKAWA, 1923; OEHME, 1962). Die tiefe, konvexe Form der Fovea wie sie bei Fischen, Reptilien und Vögeln vorkommt, bezeichnet WALLS (1942) als konvexiclivat. Nach ihm dient die Sehgrube der Eliminierung von Streulicht und führt zu einer Bildvergrößerung. Die Tiefe der Fovea kann somit als Maßstab für die Sehschärfe angesehen werden (WOOD, 1917). PUMPHREY (1948) ergänzt, dass sie der besseren Lokalisierung sich bewegender Objekte im Sichtfeld dient. Neben der konvexiclivaten nasal liegenden Fovea centralis, existiert noch eine temporal liegende konkaviclicate Fovea temporalis, wie in Abbildung 3, Seite 7 zu sehen.

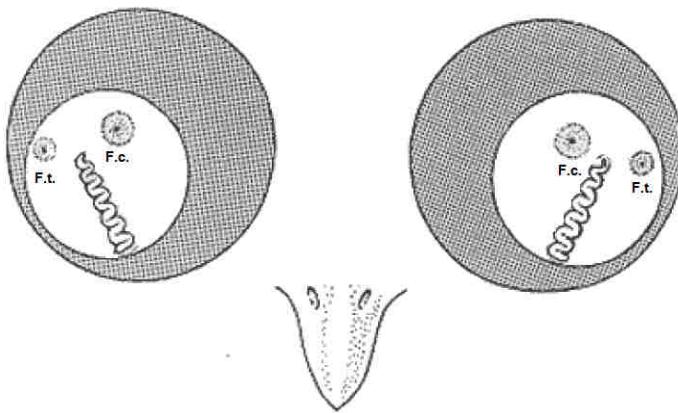


Abbildung 3: Lokalisation der Foveae bei tagaktiven Greifvögeln

F.c. – Fovea centralis; F.t. – Fovea temporalis

aus REESE et al. (2009)

Erstgenannte dient dem monokularen Sehen (KORBEL, 1994). Die Lokalisation der Fovea temporalis ist von der Augenposition abhängig. Bei nach vorne gerichteten Bulbi kommt sie der Fovea centralis näher und ermöglicht ein binokulares Sehen. Abbildung 4 veranschaulicht die verschiedenen Sichtfelder (WOOD, 1917; DUKE-ELDER, 1976; REESE et al., 2009). Dabei ist die Weite des binokularen Felds abhängig von der Kopfform und der Position der Augen. Vögel mit schmalen Köpfen und lateral angeordneten Augen weisen ein großes Gesamtsichtfeld von 300° auf, das binokulare Sichtfeld weist allerdings nur maximal 10° bis 30° auf. Greifvögel mit ihrer runden Kopfform und frontal ausgerichteten Bulbi haben ein geringes Gesamtsichtfeld von 180°, erreichen aber das größte binokulare Feld von bis zu 80° (DUKE-ELDER, 1958 zitiert nach ROCHON-DUVIGNEAUD, 1933).

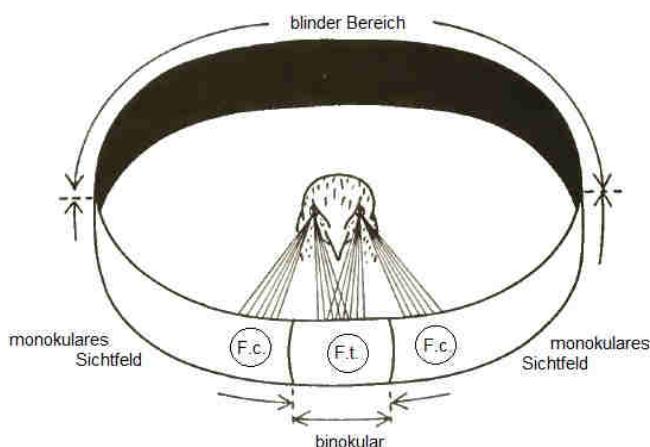


Abbildung 4: Sichtfeld eines Greifvogels

F.c.– Fovea centralis für den Rundumblick bei der Suche nach Beute

F.t.– Fovea temporalis für das stereoskopische Sehen beim Angriff

aus DUKE-ELDER (1976) nach ROCHON-DUVIGNEAUD (1933)

Die Ausbildung, Anzahl und Lage der Areae und Foveae variieren speziesspezifisch, sodass sie in unterschiedliche Klassen eingeteilt werden können. Domestizierte Arten, wie zum Beispiel das Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*), besitzen eine zentrale runde Area centralis rotunda ohne Fovea. Die Area ist somit als afoveal zu bezeichnen. Die meisten Vogelarten besitzen jedoch eine Area centralis rotunda mit zugehöriger Fovea centralis und sind somit monofoveal (DUKE-ELDER, 1976; REESE et al., 2009). Zu der monofovealen Klasse gehören außerdem Eulen, welche nur eine Area temporalis besitzen, in der eine flache Grube ausgebildet sein kann. Eine streifenförmige, ebenso monofoveale Area kommt bei vielen Wasser- und Ufervögeln vor (Area centralis horizontalis mit Fovea centralis). Als bifoveal werden die meisten Taggreife bezeichnet, die sowohl eine Area und Fovea centralis besitzen als auch eine Area und Fovea temporalis. Die temporale Fovea ist meist deutlich flacher (außer bei Habichten und Adlern) und weniger gut sichtbar als die Zentrale (DUKE-ELDER, 1976; INZUNZA et al., 1991). Die Klassifizierung zeigt auf, dass eine Area ohne Fovea vorkommen kann, eine Fovea ohne Area jedoch nicht existiert (WOOD, 1917). Die interspezifische topographische Variation der Retina ist vom Lebensraum und dem Verhaltensmuster abhängig (LISNEY et al., 2012).

Schlussendlich ist noch besonders hervorzuheben, dass die aviäre Retina im Gegensatz zu den Säugetieren, keine Gefäße besitzt. Sie ist avaskulär. Die Ernährung der Netzhaut gelingt über das Kapillarnetz der Lamina choroidocapillaris und über den stark durchbluteten Pecten oculi (MEYER, 1986; REESE et al., 2009).

2.1.2 Pecten oculi

Die herausragendste Struktur, die bei der ophthalmologischen Untersuchung sichtbar wird, ist der Augenfänger des Vogels – Pecten oculi (BACSICH und GELLÉRT, 1935; DUKE-ELDER, 1976). Der Pecten stellt ein trapezförmiges, schwarz pigmentiertes, plattenartiges Gebilde dar, welches über die Eintrittsstelle des Nervus opticus in den Glaskörper ragt (MANN, 1924; BAWA und YASHROY, 1974; KIAMA et al., 1998). Er besteht aus einem dichten Netz an Kapillaren und aus Zellen bindegewebigen Ursprungs, sowie Melanozyten (BACSICH und GELLÉRT, 1935; BRAEKEVELT, 1993; KORBEL et al., 1999). Dabei handelt es sich um ein „Derivat der Retina“, welches in dieser Ausprägung nur bei den Vögeln vorkommt und Ähnlichkeit zum Conus papillaris der Reptilien aufweist (REESE et al., 2009). Muskel- oder Nervanteile sind nicht vorhanden (MEYER,

1986). In der Regel ist der Augenfächer bei den tagaktiven Vertretern differenzierter und größer aufgebaut als bei den Nachtaktiven. Bei tagaktiven Arten, wie dem Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*) wurden beispielsweise 16 bis 18, bei der Haustaube (*Columba livia domestica*) 18, beim Strauß (*Struthio camelus*) 20 und beim Rotschwanzbussard (*Buteo jamaicensis*) 17 bis 18 Falten gezählt, wohingegen der Virginia-Uhu (*Bubo virginianus*) nur sieben bis acht Falten aufweist (KAJIKAWA, 1923; KING und MCLELLAND, 1984; BRAEKEVELT, 1991, 1993; KORBEL et al., 1999). Die Anzahl der Falten fällt somit sehr unterschiedlich aus. Dennoch ist es möglich systematische Rückschlüsse zu ziehen, da Übereinstimmungen und konstante Werte innerhalb von Familien und Arten auftreten (BACSICH und GELLÉRT, 1935). Die variable Form des Pectens lässt eine Unterteilung in 3 verschiedene Gruppen zu (MEYER, 1986; REESE et al., 2009):

- Faltentyp (Pecten plicatus oculi)
- Flügel- oder Fahnentyp (Pecten vanellus oculi)
- Konustyp (Pecten conicus oculi)

Zur ersten Gruppe gehören mit den Kielbrustvögeln (Carinata) die meisten Vogelarten. Die vertikalen Falten laufen zur Spitze des Pectens zusammen und sind zu einer Brücke zusammengewachsen. Zum Flügel- oder Fahnentyp zählen Strauß (*Struthio camelus*), Emu (*Dromaius novaehollandiae*) und Nandu (*Rhea americana*) als Vertreter der Flachbrustvögel (Ratitae). Der Konustyp stellt eine stark reduzierte Form des Augenfächers dar und wird nur vom Kiwi vertreten (MEYER, 1986; REESE et al., 2009). Neben der Form variiert auch die Krümmung und Länge des Pectens (KING und MCLELLAND, 1984). BACSICH (1935) beobachtete, dass der Korneadurchmesser, außer bei den Eulen, sehr genau der Größe des Pectens entspricht. Zur Funktion des Augenfächers gibt es seit seiner Entdeckung über 30 verschiedene Theorien (BACSICH und GELLÉRT, 1935; DUKE-ELDER, 1976). Beispielsweise soll er zum Mechanismus der Akkommodation beitragen, als optisches Instrument dienen und vor grellem Sonnenlicht schützen, oder sogar als Sinnesorgan fungieren (MANN, 1924; BARLOW und OSTWALD, 1972). Da MEYER (1986) jedoch keine Nervenanteile feststellen konnte, wurde so die Theorie eines Sinnesorgans widerlegt. Seine Untersuchungen bestätigten einen positiven Effekt auf den intraokulären Druck, sowie zuvor KAJIKAWA (1923) und MANN (1924). KAJIKAWA (1923) schloss auch eine Erwärmung des Auges über den Pecten nicht aus. Bis heute ist die Funktion nicht sicher geklärt. Worin sich aber alle

Autoren einig sind, ist die nutritive Aufgabe des Pectens für die Retina und das Corpus vitreum (DUKE-ELDER, 1976; REESE et al., 2009). Der Übertritt von Stoffen aus den Kapillaren des Pectens konnte fluoreszenzangiographisch nachgewiesen werden (PETTIGREW et al., 1990; KORBEL et al., 1999). Die ernährende Funktion gilt demnach als gesichert. Eine Rolle des Augenfächers bei der Presso- und Thermoregulation wird heute ebenfalls als sicher angenommen (REESE et al., 2009).

2.1.3 Nervus opticus

Der Sehnerv (Nervus opticus) ist bei den Falkenartigen am besten und bei den Nachtaktivten am wenigsten entwickelt (OROSZ, 1996). Sein Verlauf vom Schädealastritt zum Augapfel ist bei den Vögeln sehr kurz. Er weist nur eine geringe oder, wie bei den starren Bulbi der Eulen, gar keine Überlänge auf (REESE et al., 2009). Die Austrittsstelle des Nervus opticus in das Augeninnere (Discus nervus optici) wird größtenteils vom Pecten verdeckt, sodass meist nur eine schmale weiß-gelbliche Aufhellung um die Pectenbasis sichtbar ist. Da in diesem Bereich weder Zapfen noch Stäbchen vorhanden sind, wird dieser auch als blinder Fleck bezeichnet (KING und MCLELLAND, 1984; REESE et al., 2009). Als besonderes Merkmal kreuzen alle Fasern des Sehnervs im Chiasma opticum vollständig (SLONAKER, 1918). Eine übereinstimmende Pupillenreaktion ist somit nicht gegeben (REESE et al., 2009).

2.2 Die optische Kohärenztomographie (OCT)

2.2.1 Einführung

Die optische Kohärenztomographie (OCT) wurde in den späten 1980ern bis frühen 1990ern entwickelt. Es handelt sich um ein nicht invasives Verfahren, welches Darstellungen mikroanatomischer Strukturen *in vivo* ermöglicht (BOPPART, 2003; DREXLER und FUJIMOTO, 2008). Dies wird durch Messungen von rückreflektiertem Licht und dessen Echozeitverzögerung erreicht (D. HUANG et al., 1991; POPESCU et al., 2011). Die verschiedenen Kontraste innerhalb der Aufnahme entstehen durch unterschiedliche Brechungsindizes und Streuungen des Gewebes, ohne dass ein Kontaktmedium nötig ist (BOCCARA und DUBOIS, 2013). Auf diese Weise entstandene Bilder erinnern sehr an histologische Schnitte und kommen diesen auch hinsichtlich der Qualität sehr nah (FERCHER et al., 2003; VAN VELTHOVEN et al., 2007; RUGGERI et al., 2010). So überschreitet die räumliche Auflösung der optischen Kohärenztomographie mit eins bis 15 Mikrometern die des Ultraschalls, aber auch die der Magnetresonanztomographie sowie der Röntgentechnik. Lediglich die optische Mikroskopie erreicht eine höhere Auflösung (DREXLER und FUJIMOTO, 2008; BOCCARA und DUBOIS, 2013). Die maximale Bildtiefe der OCT bei streuenden Geweben übertrifft jedoch mit ein bis zwei Millimetern die Mikroskopie (L. V. WANG und WU, 2007; BOCCARA und DUBOIS, 2013).

2.2.2 Technische Grundlagen

Optisch stellt die OCT ein Analogon zum B-Mode des Ultraschalls dar (POPESCU et al., 2011). Es gibt allerdings einen fundamentalen Unterschied zwischen diesen beiden bildgebenden Verfahren: Die optische Kohärenztomographie nutzt Licht- statt Schallwellen (BOCCARA und DUBOIS, 2013). Die Verwendung dieser ermöglicht durch kürzere Wellenlängen zwar eine höhere Auflösung, stellt aber auch ein Problem dar: Licht ist 150.000-mal schneller als Schall und eine direkte Messung somit unmöglich (VAN VELTHOVEN et al., 2007). Gelöst wird dieses Problem durch Anwendung der niedrig kohärenten Interferometrie (BOCCARA und DUBOIS, 2013). Das signaltragende Licht, welches von einer zu untersuchenden Probe zurückkehrt, interferiert mit Licht, das eine bekannte Weglänge zurückgelegt hat. Ermöglicht wird dies durch einen Interferometer vom sogenannten Michelson-Typ (VAN VELTHOVEN et al., 2007). Der ausgesendete Lichtstrahl einer Lichtquelle wird

mithilfe eines Strahlenteilers in zwei verschiedene Richtungen separiert. Der erste Teil legt eine bekannte Weglänge zu einem Referenzspiegel zurück (Referenzarm), wobei der zweite Teil auf die Probe trifft (Probenarm). Sowohl Referenz- als auch Probenarm werden zurückreflektiert und am Strahlenteiler wiedervereint. Dieser leitet die zusammengeführten Lichtstrahlen zu einem Photodetektor weiter, wie in Abbildung 5 dargestellt (BOPPART, 2003; VAN VELTHOVEN et al., 2007).

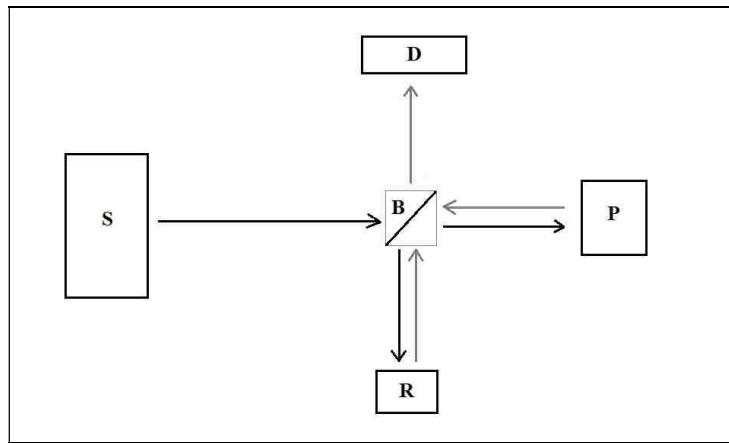


Abbildung 5: Aufbau einer Time Domain - OCT

S - Superlumineszenzdiode, B - Beamsplitter/Strahlenteiler, P - Probe, R - Referenzspiegel, D - Photodetektor

Am Photodetektor kommt es, wenn die zurückgelegten optischen Wege beider Arme übereinstimmen, zur Interferenz. Das heißt die Position des Referenzspiegels bestimmt die Tiefe innerhalb der Probe, von der aus die Reflexionen gemessen und detektiert werden. Eine Interferenz wird weiterhin nur aufgezeichnet, solange die Differenz beider Weglängen kleiner ist als die kohärente Länge der Lichtquelle (VAN VELTHOVEN et al., 2007; PODOLEANU, 2012). Beim Scannen des Referenzarms werden Reflexionsdaten eines einzigen axialen Tiefenscans erworben. Durch multiple Tiefenscans, sogenannte A-Scans, entstehen durch Veränderung der Position des Referenzspiegels entlang einer transversalen Koordinate, zwei bis dreidimensionale Daten (BOPPART, 2003; PODOLEANU, 2012). Ein solches 3D-Bild ist in Abbildung 6, Seite 13 veranschaulicht.

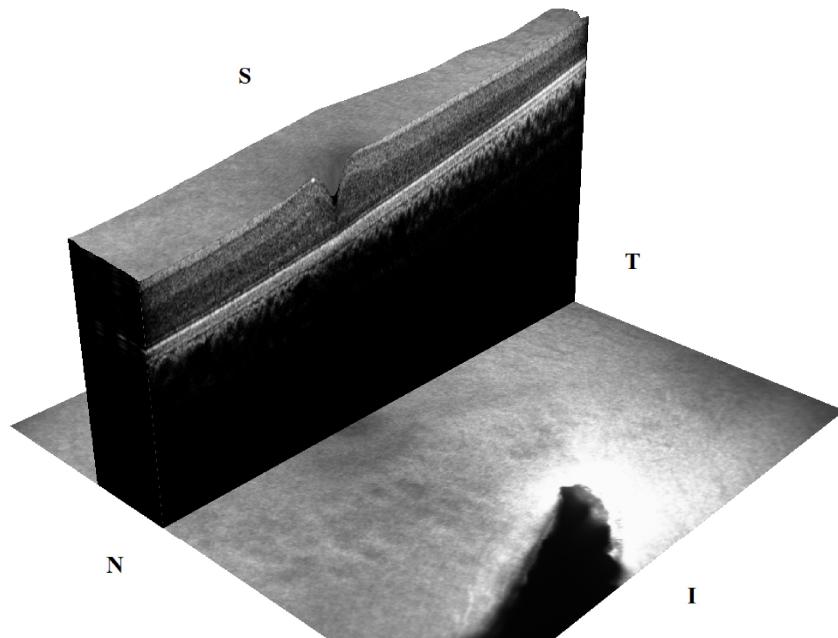


Abbildung 6: 3D-Fundusaufsicht des linken Auges eines Turmfalken (*Falco tinnunculus*)

N - nasal, T - temporal, S - superior, I - inferior

Der beschriebene Aufbau entspricht dem der sogenannten **Time-Domain OCT (TD OCT)**. Dieses System verwendet typischerweise Superlumineszenzdioden (SLD) mit einer zentralen Wellenlänge von rund 840 nm und einer axialen Auflösung von sechs μm (TOMLINS und WANG, 2005; L. V. WANG und WU, 2007; BRUNO und MARCO, 2010). Für die Bildinformationen verändert sich nur die Position des Referenzspiegels. Der Probenarm bleibt konstant (VAN VELTHOVEN et al., 2007).

Zur zweiten Haupttechnik der optischen Kohärenztomographie gehört die **Fourier-Domain (FD)**, auch **Spectral-Domain (SD)** genannt (POPESCU et al., 2011). Im Unterschied zur Time-Domain wird eine Variation der Referenzweglängen vermieden und der wiedervereinte Strahl trifft, statt auf einen Photodetektor, auf ein Spektrometer (TOMLINS und WANG, 2005). Der Spektrometer misst die Differenz der Wellenlängen zwischen dem Licht des fixen Referenzarms und dem, welches von der Probe zurückkehrt (BRUNO und MARCO, 2010). Dabei wird der vereinte Lichtstrahl in spektrale Komponenten zerstreut. Übereinstimmende Komponenten interferieren miteinander und bilden ein spektrales Interferogramm (L. V. WANG und WU, 2007). Durch Fourier-Transformation wird die FD in eine TD überführt (TOMLINS und WANG, 2005). Sämtliche Rückreflexionen können mit dieser Methode gleichzeitig gemessen werden, wohingegen die Time-Domain OCT nur einige wenige zur gleichen Zeit messen kann. Dementsprechend erreicht die FD eine höhere Bildfrequenz und

Sensitivität (L. V. WANG und WU, 2007). So können statt 400 A-Scans pro Sekunde, wie bei der herkömmlichen TD OCT, bis zu 27 000 A-Scans erzielt werden. Die Bilder sind detailreicher und liefern mehr Informationen mit verbesserter Geschwindigkeit und Genauigkeit für Tiefenanalysen (BRUNO und MARCO, 2010).

Unabhängig vom verwendeten System bestimmt letztendlich die Lichtquelle die allgemeine Leistung der OCT. Die optische Bandbreite bestimmt die axiale Auflösung und die Wellenlänge die Eindringtiefe (TOMLINS und WANG, 2005). Eine niedrige zentrale Wellenlänge ist zwar vorteilhaft für eine hohe axiale Auflösung, bei den meisten Geweben steigt jedoch mit abnehmender Wellenlänge auch die Streuung, sodass ein Optimum gefunden werden muss. Viele Anwendungen nutzen daher für Darstellungen der Netzhaut eine Wellenlänge von circa 800 nm, als Kompromiss zwischen Streuung und Absorption durch den Glaskörper (FERCHER et al., 2003).

2.2.3 Einsatzgebiete

Durch die einfache Bedienung des OCT-Geräts, seiner simplen Instandhaltung und der Erschwinglichkeit findet es in vielen Bereichen der **Humanmedizin** Anwendung (BRUGGE, 2006). Die meisten Entwicklungen erlebt es in der Ophthalmologie, Gastroenterologie und Kardiologie (DREXLER und FUJIMOTO, 2008). Im letztgenannten Bereich eröffnet die Optische Kohärenz eine Reihe von Möglichkeiten, unterliegt aber noch umfassenden Forschungen und Tests. In Form von miniaturisierten Kathetern ist es damit beispielsweise invasiv möglich Koronararterien darzustellen und pathologische Prozesse, wie atherosklerotische Plaques, zu erkennen. Zudem erweist es sich als hilfreiches Werkzeug bei der Visualisierung von Gefäßreaktionen nach Stentimplantationen (PRATI et al., 2010; VIGNALI et al., 2014; SHARMA et al., 2019; YOSHIDA et al., 2019). Im Bereich der Gastroenterologie kann es leicht mit einem Endoskop verbunden werden und so unter anderem zur Erkennung des Barrett-Syndroms oder auch von Dysplasien des Oesophagus beitragen (BRUGGE, 2006). In neueren Studien wird auch ein Einsatz der OCT bei Brustkrebs untersucht (SINGLA et al., 2019; YEMUL et al., 2019). Als klinischer Standard gilt die OCT in der Ophthalmologie (MARSCHALL et al., 2011). Ersichtlich wird die Bedeutung für dieses Fachgebiet an der Tatsache, dass 50% aller OCT-Publikationen in ophthalmologischen Journals veröffentlicht werden (DREXLER und FUJIMOTO, 2008). Durch die optischen Eigenschaften und die transpupillare Zugänglichkeit des Auges ist es als Untersuchungsobjekt für einen optischen

Kohärenztomographen hervorragend geeignet (BAUMAL, 1999). Die wichtigste Anwendung stellt hierbei die Diagnostik und Therapieüberwachung der diabetischen Retinopathie, sowie der altersbedingten Makuladegeneration dar (SCHAUDIG et al., 2000; AL-MUJAINI et al., 2013; J. C. WANG et al., 2019). Messungen der retinalen Nervenfaserschicht fungieren als Instrument bei der Diagnostik von Glaukomerkrankungen (SATHYAN et al., 2012).

Ebenso neue Möglichkeiten zur Diagnostik und Therapieüberwachung bietet die OCT in der **Veterinärmedizin**. So kann es unter anderem bei der Bewertung von equinen Gelenken und Gelenksknorpelschäden hilfreich sein (NIEMELA et al., 2014). Sie liefert dabei mehr Details und quantitative Informationen als die konventionelle Arthroskopie (TE MOLLER et al., 2013). MESA et al. (2017) und SELMIC et al. (2019) erkannten außerdem die intraoperative Nützlichkeit zur Differenzierung und Bestimmung der Ränder von Weichgewebssarkomen. Das Hauptfeld bleibt jedoch auch hier der Bereich der Augenheilkunde. Umfangreiche Untersuchungen zur Bestimmung von Normwerten verschiedenster Tierarten sind weiterhin notwendig, um künftig pathologische Prozesse besser beurteilen und Therapien zuverlässiger überwachen zu können. So gibt es schon einige Studien zur Dickenmessungen der Cornea bei Katze, Hund, Pferd, Kaninchen, Schaf, Ziege und Alpaka (REISER et al., 2005; ALARIO und PIRIE, 2013, 2014; FAMOSE, 2014; PIRIE et al., 2014; LOPINTO et al., 2017). Retinale Messungen sind ebenfalls Bestandteil vieler Analysen (GEKELER et al., 2007; PINTO und GILGER, 2014; BEMIS et al., 2017). Für zahlreiche Vogelarten wurden an der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische in Oberschleißheim verschiedene Dissertationsprojekte zur Bestimmung von Normwerten durchgeführt (VELASCO GALLEGOS, 2015; SCHULZE, 2016; SIGG, 2016). Durch die enorme Bedeutung des Visus für die Klasse Aves hat sich die OCT schnell als wichtiges Werkzeug zur Erkennung pathologischer Prozesse bewährt (RUGGERI et al., 2010; RAUSCHER et al., 2013). Künftig wäre es denkbar die OCT zur Erkennung von erblichen Retinopathien und anderen hereditären okularen Erkrankungen einzusetzen und für die Zucht seltener, wertvoller und vom Aussterben bedrohter Arten zu verwenden (MCKIBBIN et al., 2014; AZMANIS et al., 2015). Im Reptiliengebiet hat es sich die OCT ebenfalls als nützlich erwiesen, um beispielsweise Untersuchungen des vorderen Augensegments während einer Häutung zu ermöglichen (TUSLER et al., 2015).

2.2.4 Interpretation von aviären retinalen Tomogrammen

Die retinalen Tomogramme können in Graustufen (schwarz auf weiß oder weiß auf schwarz) sowie in Pseudofarben dargestellt werden. Die Wiedergabe in Graustufen ist zu bevorzugen, da geringfügige Variationen der Farbe zur Detailunterscheidung besser wahrgenommen werden können (BRUNO und MARCO, 2010). Im weiteren Verlauf wird die Schichtung bei einer weiß auf schwarz Wiedergabe beschrieben, wie in Abbildung 7 und Abbildung 8 dargestellt.

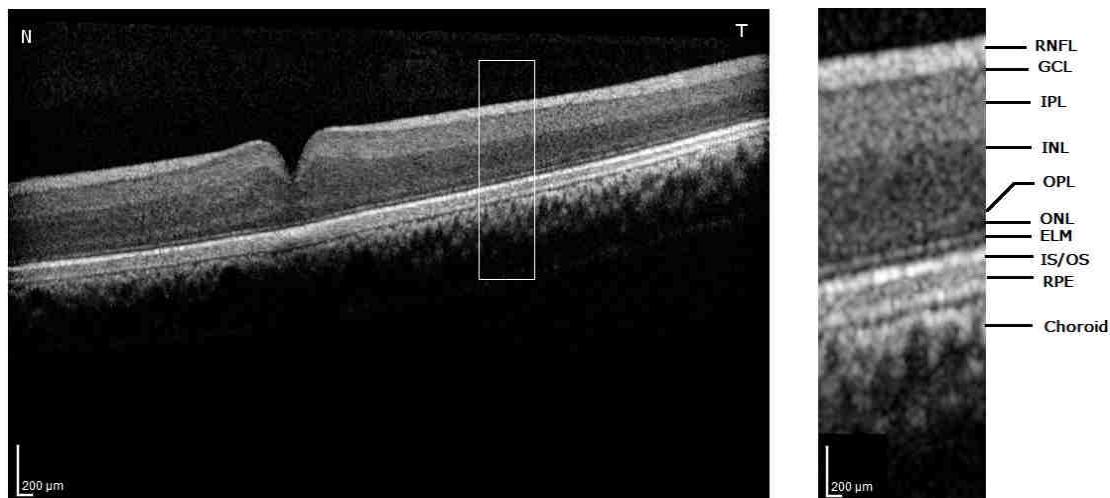


Abbildung 7: Oculus sinister mit Fovea centralis eines Turmfalken (*Falco tinnunculus*)

Darstellung der retinalen Schichtung im OCT-Tomogramm: RNFL - Retinal Nerve Fiber Layer, GCL - Ganglion Cell Layer, IPL - Inner Plexiform Layer, OPL - Outer Plexiform Layer, ONL - Outer Nuclear Layer, ELM - External Limiting Membrane, IS - Inner Segment, OS - Outer Segment, RPE - Retinal Pigment Epithelium (N - nasal, T - Temporal)

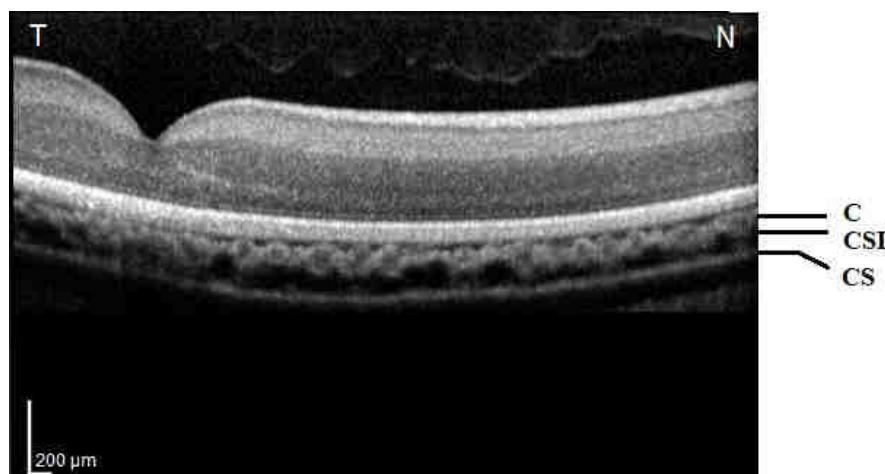


Abbildung 8: Oculus dexter mit Fovea centralis eines Mäusebussards (*Buteo buteo*)

Darstellung der Schichten posterior der Retina: C - Choroid, CSI - Choroid-Skleral-Interface, CS - Cartilaginous Sclera

Schichten wie die retinale Nervenfaserschicht (Retinal Nerve Fiber Layer – RNFL) sind sehr stark streuend. Sie stellt sich folglich als sehr helle, hoch reflektierende Schicht dar. Kernhaltige Schichten weisen stattdessen eine sehr geringe Streuung auf und werden daher als dunkle Bereiche sichtbar. Abrupte Veränderungen im Reflexionsprofil entstehen an Schnittstellen histologisch definierbarer Schichten (Y. HUANG et al., 1998). So ist als oberste Schicht die RNFL sichtbar, gefolgt von der etwas dunkleren Ganglienzellschicht (Ganglion Cell Layer – GCL), welche bei Vögeln nicht immer separat beobachtet werden kann (RUGGERI et al., 2010; MCKIBBIN et al., 2014). Weiter tiefer liegende, weniger stark streuende Schichten, stimmen mit der inneren plexiformen Schicht (Inner Plexiform Layer – IPL), der inneren Kernschicht (Inner Nuclear Layer – INL), der äußeren plexiformen Schicht (Outer Plexiform Layer - OPL) sowie der äußeren Kernschicht (Outer Nuclear Layer – ONL) überein. Als dünne helle Linie wird die äußere Grenzmembran (External Limiting Membrane – ELM) sichtbar. Darunter erscheint die Photorezeptorschicht, in der sich meist die Verbindungen zwischen innerem und äußerem Segment (Inner Segment – IS; Outer Segment – OS) differenzieren lassen. Das OS zeigt dabei im Vergleich zum IS eine stärkere Streuung und ist bei Greifvögeln auffällig breiter. Außerhalb der Rezeptorschicht liegt eine weitere helle Ebene: Das retinale Pigmentepithel (Retinal Pigment Epithelium – RPE) (RUGGERI et al., 2010). Distal des RPEs wird das Choroid (C) als heterogen streuende Schicht erkennbar, gefolgt von der Chorio-Skleralen Schnittstelle (Choroid-Skleral-Interface – CSI) und dem knorpeligen Teil der Sklera (CS – Cartilaginous Sclera) (MOAYED et al., 2011). Innerhalb der Fovea ist der beschriebene Aufbau ebenfalls vorhanden. Die GCL wird hier meist in Form einer dunklen Linie sichtbar. Die Dicke der RNFL nimmt mit zunehmenden Abstand vom Austritt des Nervus opticus ab und erreicht innerhalb der Fovea ihr Minimum (MOAYED et al., 2011). Mit dem Choroid verhält es sich umgekehrt. Am dünnsten ist es im Bereich des Discus nervus optici und am dicksten rund um die Fovea. Diese starken topografischen Variationen kennzeichnen den Greifvogel im Unterschied zum Menschen (RUGGERI et al., 2010). Bei der Darstellung in Pseudofarben (siehe Abbildung 9, S.18) wird jedem Reflexionsgrad eine bestimmte Farbe zugeordnet, dabei steht rot für eine hohe, grün für eine mittlere und schwarz für eine sehr niedrige Reflektivität (CHEN und LEE, 2007; AL-MUJAINI et al., 2013).

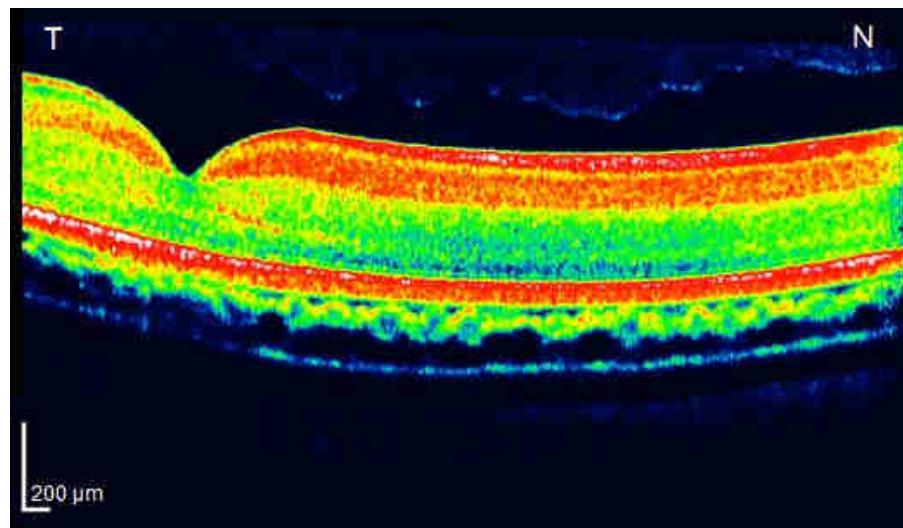


Abbildung 9: Oculus dexter mit Fovea centralis eines Mäusebussards (*Buteo buteo*)

Darstellung in Pseudofarben: Rot für hochreflektiv (RNFL, GCL & RPE), grün - niedrige Reflektivität, schwarz - sehr niedrige Reflektivität (T - temporal, N - nasal)

2.2.5 Darstellung pathologischer Veränderungen am Greifvogelfundus

Pathologische Veränderungen im OCT-Bild sind bisher bei der Klasse Aves nur bei Greifvögeln beschrieben. Solche bildlichen Aufnahmen lassen sich in Studien von AZMANIS et al. (2015), RAUSCHER et al. (2013) und RUGGERI et al. (2010) finden. Die häufigsten pathologischen Befunde sind Variationen in der Pigmentierung des Fundus, wie in Abbildung 10 zu sehen.

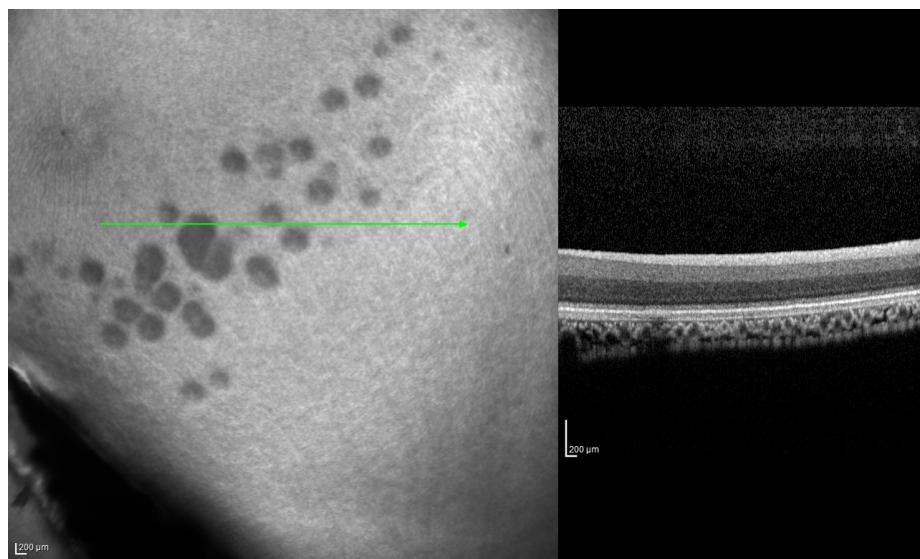


Abbildung 10: Fundus eines Wespenbussards (*Pernis apivorus*)

Sichtbare dunkle Flecken in der Fundusaufsicht, der 2D-Scan zeigt keine Veränderungen

Da diese jedoch in den bisherigen Studien im 2D-Schnittbild keinerlei Veränderungen der Retinaschichten aufwiesen und betroffene Tiere klinisch

unauffällig waren, werden diese schlussendlich als nicht pathologisch eingestuft. Weiterhin häufige Befunde sind drusenartige Veränderungen, Vakuolen, Abhebungen des retinalen Pigmentepithels und Degenerationen der äußeren Retinaschichten (RAUSCHER et al., 2013; AZMANIS et al., 2015). RUGGERI et al. (2010) zeigt zudem Aufnahmen von Retinaablösungen mit subretinalen Flüssigkeitsansammlungen. Einblutungen, wie in Abbildung 11, führen zu hyperreflektierenden Scans mit einem Schattenwurf auf posterior liegende Schichten (AL-MUJAINI et al., 2013).

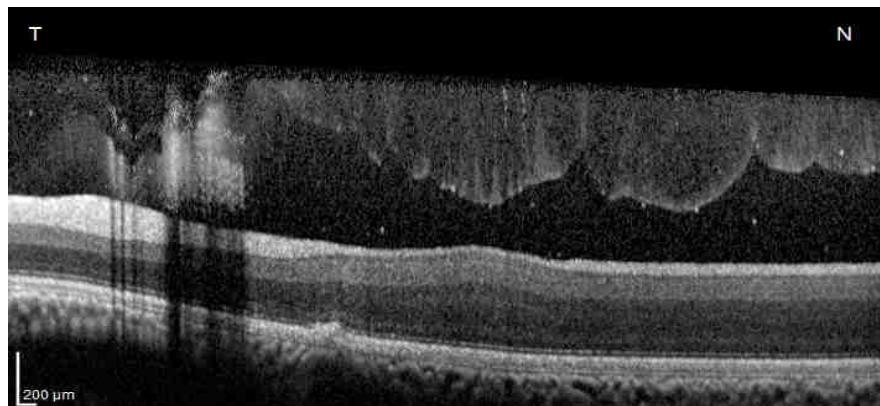


Abbildung 11: Oculus dexter eines Mäusebussards (*Buteo buteo*)

Pathologischer Fundus mit hyperreflektierenden Einblutungen und Schattenwurf auf posterior liegende Strukturen (T - temporal, N - nasal)

Mithilfe des OCTs lässt sich zum Teil auch der Glaskörper darstellen. Retraktionen des Glaskörpers und unregelmäßige Grenzen treten regelmäßig bei jungen und adulten Greifvögeln gleichermaßen auf. Diese scheinen jedoch eine normale Besonderheit zu sein, da sie nicht zwangsläufig mit pathologischen Veränderungen der Retina einhergehen (AZMANIS et al., 2015).

Die Interpretation der optischen Kohärenztomographie sollte niemals unabhängig erfolgen. Sie ist als einziges Kriterium für eine Diagnose, Therapie oder der Frage nach einer erfolgreichen Wiederauswilderung unzureichend. Dementsprechend müssen stets weitere Informationen wie z.B. die klinische Untersuchung, die Krankheitsgeschichte oder weitere diagnostische Methoden herangezogen werden (AL-MUJAINI et al., 2013; KHAROUSI et al., 2013; AZMANIS et al., 2015). Ein Zusammenhang zwischen den pathologischen Befunden und die daraus resultierende Bedeutung für den Visus des Vogels lässt sich in Ansätzen bei der Studie von AZMANIS et al. (2015) finden.

2.3 Die Konfokalmikroskopie (CLSM)

2.3.1 Einführung

Das Prinzip der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) wurde in den 50er Jahren vom amerikanischen Mathematiker Marvin Minsky entwickelt und zum Patent angemeldet (MULISCH et al., 2015; RENSHAW, 2017). Die ursprüngliche Intention war es, das menschliche Gehirn mittels gefärbter Präparate genauer untersuchen zu können, was sich aufgrund der sehr dichten Gewebestruktur bislang als schwierig gestaltet hatte. Minsky entwickelte ein Mikroskop, welches mithilfe einer Lochblende nicht die gesamte Probe beleuchtet, sondern das Präparat punktförmig scannt und so die Untersuchung dicker und dichter Schnitte ermöglicht. 1958 entstand hierfür der erste Prototyp (NAREDI-RAINER et al., 2017). Die ersten Bilder wurden allerdings erst 11 Jahre später von P. Davidovits und M.D. Egger veröffentlicht (BORLINGHAUS, 2016). In den nachfolgenden Jahren fand das System keinen großen Anklang. Die technischen Gegebenheiten und Entwicklungen waren stark limitiert. So fehlte es beispielsweise an hochenergetischen Lichtquellen wie dem Laser, um eine ausreichend gute Bildqualität zu erreichen. Erst mehr als 20 Jahre später wurde die CLSM schlussendlich als Goldstandard für die Mikroskopie anerkannt (NAREDI-RAINER et al., 2017).

2.3.2 Prinzip der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie

Bei der CLSM wird ein Laserstrahl auf einen bestimmten Punkt der Probe fokussiert. Dabei treffen Beleuchtungs- und Beobachtungsbrennpunkt zusammen, was als „konfokal“ bezeichnet wird. Besonders am Aufbau ist der Einsatz von Lochblenden. Durch Einbringen einer Lochblende in die Feldblendenebene des Mikroskops, wird im ersten Schritt ein Teil des Anregungslichts außerhalb der Fokusebene geblockt. Der passierende Lichtstrahl regt die Fluoreszenz im bestrahlten Bereich der Probe an, allerdings auch außerhalb der Fokusebene. Hierfür kommt im zweiten Schritt eine weitere Lochblende vor dem lichtempfindlichen Detektor zum Einsatz. Diese führt dazu, dass nur Licht von der Probe detektiert wird, welches die Blende passiert und die Fluoreszenz aus Nicht-Fokus-Ebenen somit geblockt wird. Störende Signale und Hintergrundinformationen werden durch diesen Aufbau zweifach minimiert. Für ein besseres Verständnis des Aufbaus ist die Abbildung 12, Seite 21 angehangen. Um die Größe des zu untersuchenden Bereichs bestimmen zu

können, ist der Durchmesser der Lochblende frei justierbar. Mit Änderung des Durchmessers verändert sich auch der Grad der Konfokalität. Eine Vergrößerung der Blende reduziert den konfokalen Effekt, sodass eine vollständige Öffnung einer nicht konfokalen Abbildung und somit der Weitfeldmikroskopie entspricht (ENGELHARDT und KNEBEL, 1993; WILHELM et al., 2003; JONKMAN und BROWN, 2015; MULISCH et al., 2015; RENSHAW, 2017).

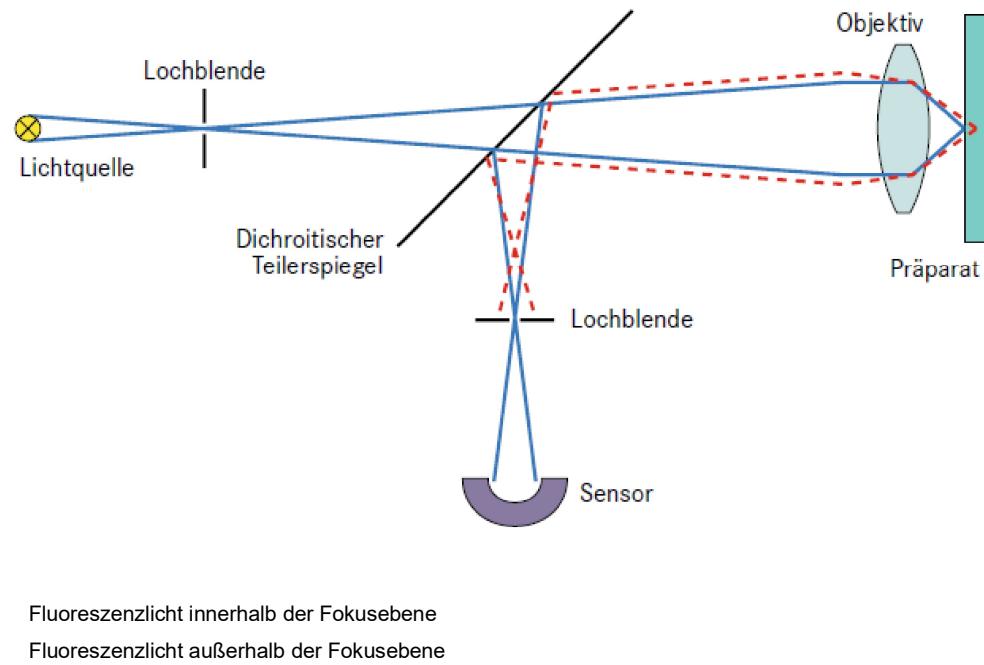


Abbildung 12: Prinzip der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie

Durch die in der Bildebene konjugierten Lochblenden wird nur die Fluoreszenz in der Fokusebene detektiert.

aus MULISCH et al. (2015)

Die Probe wird Punkt für Punkt abgerastert. Das Mikroskop wird daher gern als „Punktscanner“ bezeichnet (WILHELM et al., 2003; BORLINGHAUS, 2016). Um Informationen über die gesamte Probe zu erhalten muss der Laserstrahl bewegt und die einzelnen Punkts cans für ein ganzheitliches Bild zusammengesetzt werden. Auf diese Weise ist es möglich durch Abtasten in axialer Richtung räumliche Informationen mithilfe von 3D-Datensätzen zu erhalten. Nach jeder Aufnahme wird der Fokus um einen bestimmten Betrag geändert, welcher idealerweise der Hälfte der Schichtdicke entspricht. Wird der Abstand zwischen zwei Aufnahmen zu groß gewählt, kann kein zusammenhängendes Bild mehr entstehen (WILHELM et al., 2003; BORLINGHAUS, 2016). Die CLSM erreicht eine axiale Auflösung von 500 nm und eine laterale Auflösung von 200 nm (MULISCH et al., 2015). Mithilfe dieser Technik können bis zu 100 µm dicke Proben in „optische Schnitte“ zerlegt werden (WILHELM et al., 2003). Für viele

Anwendungen wird eine hohe zeitliche Auflösung sowie niedrige Belichtungsintensitäten zur Vermeidung von phototoxischen Schäden benötigt. Das führte zur Entwicklung vieler verschiedener Formen und Abwandlungen der CLSM. Einer der meist verwendeten stellt dabei die Spinning Disk konfokale Mikroskopie (SDCM) dar (OREOPOULOS et al., 2014). Sie vereint die Vorteile der konfokalen Mikroskopie mit der Echtzeit-Datenerhebung der Weitfeldmikroskopie. Das heißt die benötigte Zeit für den Scancvorgang wird erheblich verkürzt, indem die Probe mithilfe mehrerer Lochblenden gleichzeitig gescannt wird. Ermöglicht wird dies durch den Einsatz einer sich rotierenden Scheibe mit zahlreichen Löchern – die sogenannte Nipkow-Disk, erfunden vom deutschen Techniker Paul Nipkow. Durch Einbringen in eine konjugierte Bildebene, ist es damit möglich jeden beliebigen Punkt der Probe gleichzeitig und in kürzester Zeit zu scannen (NAREDI-RAINER et al., 2017).

2.3.3 Vorteile gegenüber der konventionellen Mikroskopie

Im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie bietet die CLSM die Möglichkeit Strukturen räumlich in Form von 3D-Abbildungen darzustellen und quantitativ auszumessen (ENGELHARDT und KNEBEL, 1993). Weitere Vorteile werden vor allem bei fluoreszenzmarkierten Proben sichtbar (WILHELM et al., 2003). Bei einem Fluoreszenzmikroskop wird nicht nur die Fluoreszenz in der Fokusebene angeregt, sondern auch ober- und unterhalb dieser. Es kommt zu einer Überlagerung der Signalinformationen, die sich als Unschärfe darstellt. Besonders bei dicken und streuenden Präparaten ist dies ein Problem, da einzelne Strukturen nicht mehr voneinander abgrenzbar sind, was die Untersuchung erheblich erschwert. Die konfokale Mikroskopie reduziert jene Hintergrundinformationen. Das Streulicht außerhalb der Brennebene wird unterdrückt und nur Licht der fokussierten Ebene detektiert mit dem Ergebnis einer besseren optischen Auflösung und eines höheren Bildkontrastes (siehe Abbildung 13, S. 23) (ENGELHARDT und KNEBEL, 1993; MULISCH et al., 2015; BORLINGHAUS, 2016). In Verbindung mit der Fluoreszenz ermöglicht die CLSM nicht nur Studien an fixierten Geweben sondern auch die Untersuchung biologischer Vorgänge *in vivo* (ENGELHARDT und KNEBEL, 1993; RENSHAW, 2017).

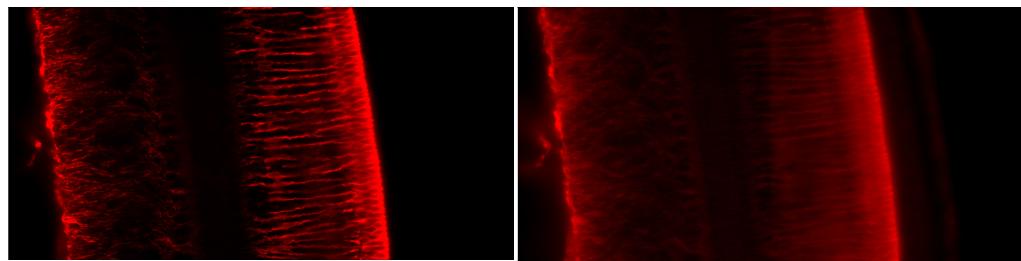


Abbildung 13: Vergleich Fluoreszenzmikroskop mit und ohne Spinning Disk

Retina eines Mäusebussards (*Buteo buteo*), 25 µm dicker Schnitt, Rot dargestellt die Müllergliazellen; Links: Konfokalmikroskopie mit Spinning Disk; Rechts: Fluoreszenzmikroskopie ohne Spinning Disk

2.3.4 Grundlagen der Immunhistochemie

Um Proben mittels Fluoreszenz darzustellen und somit die Vorteile der CLSM optimal nutzen zu können, ist es notwendig die Grundlagen der Immunhistochemie zu kennen. Die Immunhistochemie unterscheidet grundsätzlich zwei Hauptmethoden: Die direkte und indirekte Immunfluoreszenz (IF). Bei der direkten oder auch primären IF handelt es sich um die Ältere beider Methoden. Der primäre Antikörper (AK) ist dabei direkt mit einem fluoreszierenden Farbstoff oder Enzym markiert und reagiert mit dem passenden Antigen im Gewebe, der gesuchten Zielstruktur. Durch die Verwendung eines einzigen AKs ist diese Methode schnell abgeschlossen und unspezifische Bindungen werden limitiert. Allerdings wird hierdurch nur eine geringe Signalverstärkung erreicht, was die Methode für heutige Zwecke nicht sensitiv genug gestaltet. Bei der indirekten, sekundären IF erfolgt eine Inkubation in zwei Schritten: Ein ungebundener primärer AK bindet zuerst an sein Antigen, um im zweiten Schritt von einem markierten sekundären AK selbst gebunden zu werden (siehe Abbildung 14).

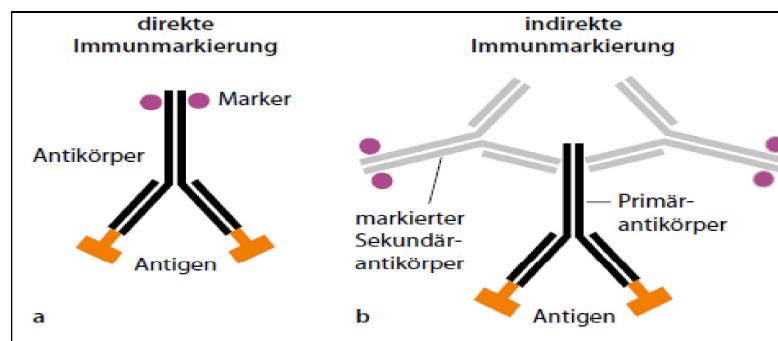


Abbildung 14: Direkte und indirekte Immunfluoreszenz

a) ein markierter primärer AK bindet direkt an das Antigen b) ein markierter Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper
aus MULISCH et al. (2015)

Eine spezifische Bindung des sekundären AKs an den Primären wird dadurch erreicht, dass dieser gegen die Spezies gerichtet ist, von dem der primäre AK stammt. Das heißt, wenn der primäre AK zum Beispiel aus einer Maus gewonnen worden ist, muss der sekundäre AK gegen die Maus-Immunglobuline gerichtet sein. Diese Methode ist durch die Kombination vieler verschiedener primärer AK mit einem markierten sekundären AK sehr vielseitig. Durch die multiplen Bindungsmöglichkeiten sekundärer AK-Moleküle an die Epitope des Primären tritt eine beachtliche Signalverstärkung auf und die Sensitivität steigt. Neben dieser sogenannten Zwei - Schritt - Methode ist noch die Drei - Schritt - Methode erwähnenswert, bei der ein zweiter markierter AK zu der bereits beschriebenen indirekten Methode hinzukommt und das Signal sowie die Färbung weiter verstärkt (BOENISCH, 2001; MULISCH et al., 2015; HOFF, 2015). Eine weit verbreitete und verwendete Möglichkeit das Signal des Zielantigens noch weiter zu verstärken ist der (Strepta-)Avidin-Biotin-Komplex (ABC). Diese Technik nutzt die hohe Affinität von Avidin, aus dem Hühnereiweiß, und Streptavidin, ein Protein aus Streptomyces avidini, zu Biotin. Sowohl Avidin als auch Streptavidin bestehen aus vier Untereinheiten, die in der Theorie jeweils ein Biotinmolekül binden können. Aufgrund der räumlichen Anordnung können tatsächlich aber nur 3 Biotinmoleküle gebunden werden. Diese reichen jedoch für eine erhebliche Signalverstärkung im Vergleich zur herkömmlichen Immunmarkierung aus. Die (Strepta-)Avidin-Biotin-Bindung ist zudem die am stärksten bekannte, nicht-kovalente Interaktion zwischen Protein und Ligand. Die Bindung erfolgt sehr schnell und einmal gebunden ist sie gegenüber äußeren Einflüssen wie extremen pH-Werten oder Temperaturen beständig. Bei der ABC - Methode wird ein primärer AK von einem biotinylierten sekundären AK gebunden, gefolgt von einem Avidin-Biotin-Enzym-Komplex, wobei als Enzym häufig die Meerrettich-Peroxidase verwendet wird (siehe Abbildung 15, S. 25).

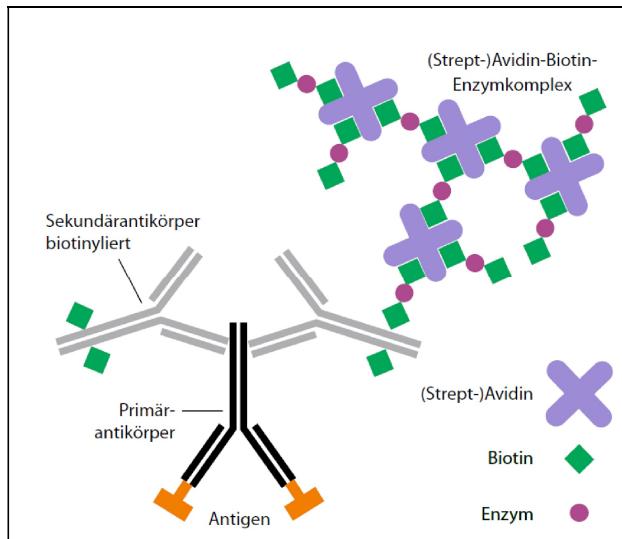


Abbildung 15: Schema der (Strept-) Avidin-Biotin-Komplex Technik

Ein biotinylierter Sekundärantikörper bindet an den Primären AK. Der sekundäre AK selbst wird durch einen (Strept-)Avidin-Biotin-Enzymkomplex gebunden.

aus MULISCH et al. (2015)

Avidin wird heute weitestgehend durch Streptavidin (*Streptomyces avidinii*) ersetzt, da es sich als sensitiver erwiesen hat und eine geringere unspezifische Hintergrundmarkierung verursacht (BOENISCH, 2001; MULISCH et al., 2015).

2.3.5 Einsatzgebiete

Die Anwendungsgebiete der CLSM sind überaus vielfältig und kaum Grenzen gesetzt. Mithilfe einiger Beispiele soll im Folgenden lediglich ein Eindruck der zahlreichen Verwendungen vermittelt werden. Durch das ermöglichen von *in vivo* Untersuchungen findet die CLSM auf diese Weise häufig Anwendung. Aktuell sind hierzu Studien der Kornea, wie beispielsweise die Wundheilung nach Keratoplastik, Evaluierungen von Behandlungen gegen mykotisch bedingte Keratitis oder Trockenheit und die Darstellung weiterer pathologischer Zustände der Kornea bei z. B. Diabetes oder multiplem Myelom zu finden (ABDELKADER et al., 2010; ALSHEHRI et al., 2016; DEHGHANI et al., 2016; D. WANG et al., 2016; BUSCH et al., 2017; KUMAR, 2017). Kerngebiete im medizinischen Bereich stellen die Hirnforschung und die Anordnung seines Neuronennetzwerkes, sowie die dreidimensionale Untersuchung von Zellstrukturen und -vorgängen bei der Krebsforschung dar. In der Chirurgie ermöglicht die CLSM quantitative Beschreibungen von Frakturoberflächen oder Vermessungen und Untersuchungen von Implantatoberflächen, um die Verträglichkeit bestimmen zu können (ENGELHARDT und KNEBEL, 1993;

MERSON et al., 2016). In der Biologie hilft es bei der Darstellung von Zellorganellen und Zytoskeletten (ENGELHARDT und KNEBEL, 1993; ROSERO et al., 2014). Durch die möglichen quantitativen Messungen und Oberflächenanalysen erweist sich die CLSM auch fernab der Medizin als gebräuchliches Werkzeug und kommt zum Beispiel in der Industrie sowie in der Paläontologie zum Einsatz (ENGELHARDT und KNEBEL, 1993; GAVRILOVA et al., 2018).

2.4 Histologische Präparation des Auges

2.4.1 Enukleation

Die Enukleation bei Vögeln bringt anatomisch einige Herausforderungen mit sich. Die straffe Verbindung des Bulbus zur Orbita bietet kaum Raum für nötige chirurgische Instrumente. Die Knochen der Orbita sind pneumatisiert und können somit leicht beschädigt werden und zu Verletzungen führen. Zudem werden beide Augen nur durch ein sehr dünnes Septum interorbitale getrennt, welches oftmals lediglich aus einem dünnen Häutchen besteht, sodass es leicht zu Verletzungen des kontralateralen Auges kommen kann (KORBEL, 1991). Techniken für die Enukleation bei Säugetieren können somit nicht direkt übernommen werden. Für die Entnahme der Bulbi bei Vögeln beschreibt MURPHY et al. (1983) zwei verschiedene operative Methoden. Die erste Methode eignet sich nur für Eulen und erfolgt über das Ohr. Der anästhesierte Vogel wird in Seitenlage gebracht und die Augenlider mithilfe von je zwei Nähten gehalten. Mit einem Skalpell erfolgt eine Inzision lateral des Augenwinkels zum Ohr ziehend durch die Konjunktiva und die periorbitale Faszie. Mithilfe einer Schere wird das periokuläre Gewebe vorsichtig entfernt bis sich der posteriore Anteil des Bulbus vollständig darstellt. Anschließend wird ein Finger auf den Limbus des Auges gelegt und leichter Druck nach medial ausgeübt, um mit einem Skalpell den Globus leicht von der Orbita zu lösen. In die entstandene Lücke kann nun eine Tenotomie-Schere eingeführt werden, extraokuläre Strukturen gelöst und der Sehnerv durchtrennt werden. Bei anderen Vogelarten erfolgt eine Enukleation über einen Zusammenfall des Globus. Dabei wird das Auge am Limbus eingeschnitten und ein Haltefaden in die eingeschnittene Cornea eingebracht. Anschließend erfolgt der Kollaps des Globus durch einen vorsichtigen Schnitt zwischen Uvea und Sklera. Über diesen Einschnitt kann dann der hintere Teil des Auges vom Sehnerv und extraokulärem Gewebe

getrennt werden. Diese zweite Methode ist durch die Zerstörung des Auges für eine histologische Untersuchung jedoch gänzlich ungeeignet und nur für operative Zwecke gebräuchlich. Für postmortale Untersuchungen etablierten SAUNDERS und JUBB (1961) mittels Hundeäugn eine Technik, die auf weitere Tierarten übertragbar ist. Mittels einer gezahnten Pinzette werden die Augenlider am lateralen Winkel zusammengehalten und mit einem Skalpell das Auge kreisförmig umschnitten. Anschließend greift eine Pinzette die Konjunktiva unterhalb des Bulbus und zieht diesen leicht nach ventral, um die Konjunktiva oberhalb des Augapfels einschneiden zu können. Die Inzision ermöglicht die Einführung einer stumpfen, gebogenen Schere, welche den Bulbus von anhaftenden Muskeln und dem Sehnerv trennt. Eine sachgemäße Enukleation muss in erster Linie Artefakte, welche mit Läsionen verwechselt werden können, verhindern und echte Läsionen wiederum für eine genaue Untersuchung erhalten. Die sehr schnelle Stoffwechselaktivität des Auges führt zu einer raschen postmortalen Autolyse. In der Studie von SAUNDERS und JUBB (1961) zeigten sich an den untersuchten Hundeäugn bereits nach 5 Minuten autolytische Veränderungen. Ziel einer Enukleation sollte es folglich sein, beide Augen in weniger als 5 Minuten zu entfernen und zu fixieren (PARRY, 1953; SAUNDERS und JUBB, 1961). Das Auge muss während der gesamten Prozedur sehr vorsichtig gehandhabt werden. Ein lokaler Druck auf die Sklera reicht aus für die Entstehung von artifiziellen Netzhautablösungen, die eventuell nicht mehr als post- oder antemortem differenziert werden können und eine Untersuchung erschweren. Es ist zudem zwingend erforderlich jegliches anhaftende Gewebe sorgfältig zu entfernen, damit eine ungleichmäßige Schrumpfung während der Dehydratation verhindert wird (SAUNDERS und JUBB, 1961; RAVELHOFER, 1996; WERTHER et al., 2011).

2.4.2 Fixation

In der Theorie soll eine Fixierung das Gewebe und seine Zellen in seiner natürlichen und physiologischen Form erhalten. Dabei sollten Größe und Form unverändert bleiben und die Probe optimal für weitere Untersuchungen vorbereitet werden. Keine Art der Fixierung kann all diese Kriterien zu gleichen Teilen erfüllen (MULISCH et al., 2015). Eine Fixierung geht in der Regel mit einer Schrumpfung einher (LANG, 2013; MULISCH et al., 2015). Da das Auge sich aus verschiedensten Gewebearten zusammensetzt, die jeweils unterschiedliche Diffusions- und Durchdringungseigenschaften besitzen, ist die Art der Fixation abhängig von der zu untersuchenden Struktur (SAUNDERS und JUBB, 1961;

MCKAY et al., 2009). Zur Fixationstechnik selbst lassen sich unterschiedliche Methoden finden (YANOFF et al., 1965; KUNERT et al., 1999; BAUMANN et al., 2015). Das Auge sollte für eine histologische Untersuchung im Ganzen fixiert werden (MCKAY et al., 2009). Aufgrund des starren Skleralrings kommt es im Rahmen der Fixation mit Flüssigkeitsverlust im Auge zum Einsinken der Kornea. Es treten Einziehungen des hinteren Augensegmentes auf, die wiederum artefizielle Netzhautablösungen bedingen. Um diesen Effekt zu vermeiden, ist es notwendig das Fixativ in die vordere Augenkammer zu verbringen und mittels Parazentese (Injektion in die vordere Augenkammer durch den Limbus corneae) aufzufüllen. Ein Kollabieren aufgrund des Wasserentzugs während des Schrumpfungsprozesses im Rahmen der Fixation wird so verhindert. Durch eine fixationsbedingte Verhärtung des Gewebes ist eine Parazentese und Auffüllen der vorderen Augenkammer nur innerhalb eines engen Zeitraums nach der Enukleation und Verbringen ins Fixativ möglich (KORBEL, 1994).

Für histologische Untersuchungen wird ein rasch eindringendes Fixiermittel benötigt. Hierfür ist nach SAUNDERS und JUBB (1961) Formalin gänzlich ungeeignet. Die Fixierung durch Eintauchen in Formalin erfolgt zu langsam, als dass sie autolytische Prozesse oder eine postmortale Netzhautablösung verhindern könnte (SAUNDERS und JUBB, 1961). Dennoch wird Formalin routinemäßig eingesetzt. Seine Eigenschaften Farbe, Form und Strukturen sehr gut zu konservieren, dicke Gewebestrukturen zu durchdringen und auch nach längerer Fixierzeit die Anfärbbarkeit des zu untersuchenden Gewebes nicht zu beeinflussen, machen Formalin zu einem der bekanntesten und am häufigsten verwendeten Fixiermittel in der Histologie (MULISCH et al., 2015). Eine Studie von WERTHER et al. (2011) beschreibt den Einfluss einer Formalinfixation bei Vogelaugen. Dabei wurde, je nach Größe des Auges, nach 48 Stunden eine maximale Formalinkonzentration im Auge erreicht. Mehr als die Hälfte der untersuchten Augen zeigten nach der Fixierung eine Volumenabnahme, der Rest sogar eine Zunahme des Volumens. Mit zunehmender Fixationszeit stieg das Risiko einer Retinaablösung, welche nach sechs Monaten in 100 % der Fälle auftrat. SAUNDERS und JUBB (1961) präferieren aufgrund dieser negativen Effekte Zenker Fixierlösung mit Essigsäure für die Fixation. Eine andere Studie von YANOFF et al. (1965) beschreibt die Fixierung von Augen mit Glutaraldehyd, welche ebenfalls bessere Ergebnisse als eine Fixierung mit Formalin erzielt. Mehr Studien lassen sich zu einer alternativen Fixierung mit Davidson finden. Davidson zeigt sich als optimales Fixans für die Retina. Es ist hinsichtlich des Erhalts der Morphologie Formalin überlegen. Die Zellschichten sind besser und

schärfer voneinander abgrenzbar und die Enden der sensorischen Zellen (Stäbchen und Zapfen) hervorragend darstellbar. Zudem zeigt sich nur in Einzelfällen eine fixationsbedingte Netzhautablösung, welche regelmäßig bei Fixierungen mit Formalin auftreten (LATENDRESSE et al., 2002; MCKAY et al., 2009). CHIDLOW et al. (2011) beschreibt neben den vielen Vorteilen der Davidsonfixierung aber auch Nachteile. Durch den hohen Alkoholgehalt der Lösung wird das Gewebe brüchig, folglich schlechter schneidbar und haftet weniger gut auf Objektträgern. In wie weit sich Davidson auch für weiterführende immunhistochemische Untersuchungen besser eignet als Formalin wird in sehr wenigen Studien thematisiert. Für die meisten bisher untersuchten Antikörper zeigt sich Davidson jedoch ebenso kompatibel und überzeugt zugleich mit besseren Ergebnissen (MCKAY et al., 2009; CHIDLOW et al., 2011).

III. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Patientengut

Bei den Probanden handelt es sich um Greif- und Eulenvögel aus freier Wildbahn, welche verletzt oder flugunfähig aufgefunden worden sind und von ihren Findern in die Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München eingeliefert wurden. Dabei wurden 50 physiologische Augen von 27 Tieren aus fünf Arten im Zeitraum von November 2017 bis Dezember 2018 für die vergleichenden Vermessungen in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Neuroanatomie der LMU untersucht. Diese sind zusammenfassend in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Art und Anzahl des Patientenguts

Systematik: LINNAEUS 1758	Gesamt	Männlich	Weiblich	Geschlecht unbekannt
Accipitriformes	15			
Habicht (<i>Accipiter gentilis</i>)	2			2
Mäusebussard (<i>Buteo buteo</i>)	8	1		7
Sperber (<i>Accipiter nisus</i>)	5	1	1	3
Falconiformes	9			
Turmfalke (<i>Falco tinnunculus</i>)	9	1	4	4
Strigiformes	3			
Waldohreule (<i>Asio otus</i>)	3			3

Der Turmfalke (*Falco tinnunculus*) war mit 9 Individuen am häufigsten vertreten. Bei 19 Tieren konnte keine sichere Zuordnung des Geschlechts aufgrund eines nicht eindeutig feststellbarem Geschlechtsdimorphismus erfolgen. Diese wurden als unbekannt kategorisiert. Bei dem Alter der Vögel konnte lediglich eine Einteilung in adult, subadult (Übergang juvenil zu adult, Adultgefieder noch nicht ausgebildet) und juvenil erfolgen.

Im Rahmen der klinischen Routineuntersuchung sollte neben einer gründlichen Allgemeinuntersuchung des Patienten, insbesondere bei Greifvögeln mit Verdacht auf Anflugtrauma, eine sorgfältige ophthalmologische Untersuchung erfolgen. Der erste Teil der verwendeten Probanden bestand aus Traumapatienten bei denen der Verdacht auf okuläre Veränderungen bestand. Entsprechend medizinischer Indikation wurden diese Tiere mittels OCT untersucht. In die histologische Auswertung mit einbezogen wurden nur jene Patienten, bei denen aufgrund des Augenbefundes (einseitige Veränderungen) oder erfolgloser Therapie keine Heilung und Wiederauswilderung möglich war und sich somit die Euthanasie anschloss. Ein weiterer Teil der Probanden setzte sich aus Patienten zusammen, bei denen schon während der klinischen Allgemeinuntersuchung, also noch vor jeglicher Beurteilung des Visus, eine infauste Prognose feststand. Diese Tiere wurden gemäß des Tierversuchsantrags 55.2-1-54-2532-46-2015 unmittelbar vor der Euthanasie mittels OCT untersucht. Die OCT-Untersuchung fand ausschließlich bei Tieren mit stabilem Allgemeinbefinden statt. Bei schmerzhaften Zuständen wie zum Beispiel Frakturen erfolgte eine sedative Analgesie mit Butorphanol (4mg/kg KM). Moribunde Tiere wurden nicht untersucht. Sämtliche Patienten wurden aus tierschutzrechtlichen und medizinischen Gründen euthanasiert und nicht für den Versuchszweck selbst.

Zusätzlich zu den vergleichenden Vermessungen, fanden mehrere Folgeuntersuchungen am OCT-Gerät zur Dokumentation von Retinaalterationen bei fünf Waldkäuzen (*Strix aluco*) und einem Mäusebussard (*Buteo buteo*) statt. Zwei dieser Fälle mussten aufgrund der progressiven und pathologischen Veränderungen am Fundus, der damit einhergehenden Visuseinschränkung und der infausten Prognose euthanasiert werden. Hier fand ein Vergleich der pathologischen Veränderungen am OCT mit der Konfokalmikroskopie statt.

Außerdem wurde die Retina eines an Amaurosis (Schönblindheit, Erblindung bei maximal geweiteter Pupille bei gleichzeitigem fehlen ophthalmologisch-/ophthalmoskopisch-pathologischer Befunde) leidenden Weißkopfseeadlers (*Haliaeetus leucocephalus*) auf zellulärer Ebene mittels Konfokalmikroskopie weiterführend untersucht.

3.1.1 Klinische Allgemeinuntersuchung

Alle Patienten der Klinik wurden einer gründlichen Allgemeinuntersuchung unterzogen, bestehend aus einer Anamnese, einer Adspektion sowie einer klinischen Untersuchung. Die Anamnese beschränkte sich bei Wildvögeln auf die Speziesfeststellung, das ungefähre Alter (adult, subadult, juvenil) sowie, wenn äußerlich erkennbar, die Zuordnung des Geschlechts (männlich, weiblich). Die Hintergrundinformationen reduzierten sich auf die Fundumstände des Tieres. Ein ausführlicher Vorbericht war somit meist nicht möglich. Bei der Adspektion wurden folgende Punkte berücksichtigt:

- Allgemeinbefinden
- Verhalten
- Körperhaltung
- Sehfähigkeit und Orientierungsvermögen
- Gefiederzustand

Die klinische Untersuchung erfolgte unter fachgerechter Fixation des Patienten und Beurteilung folgender Parameter:

- Adspektion der Augen und Ohrenöffnungen
- Adspektion der Körperöffnungen (Schnabelhöhle, Kloake)
- Beurteilung des Ernährungszustandes
- Bestimmung des Körpermengewichts
- Palpation des Abdomens
- Palpation der Extremitäten
- Greifreflex
- Adspektion des Locus minoris resistentiae
- Beurteilung des Gefiederzustandes
- Untersuchung der Körperoberfläche auf Läsionen

3.1.2 Ophthalmologische Untersuchung

Im Anschluss an die klinische Untersuchung folgte der ophthalmologische Untersuchungsgang in Anlehnung an KORBEL (1994). Die ophthalmologische Anamnese bei einem Wildvogel beschränkt sich auf die Beobachtung in Ruhe und die Beurteilung seines Verhaltens sowie seiner Orientierungsfähigkeit. Bei Verdacht auf ein Anflugtrauma kommt der Untersuchung der Ohröffnungen eine besondere Bedeutung zu, da hierüber Teile der Fundusperipherie, vor allem bei Eulen, einsehbar sind (REESE et al., 2009). Erkennbare Hämatome im Bereich der Ohröffnungen bestärken einen Verdacht auf Fundusläsionen. Nach einer

gründlichen und vergleichenden Adspektion der Augen auf Symmetrie, Verletzungen, Größen- und Formveränderungen sowie Augenausfluss und periorbitalen Federverlust, erfolgte die Beurteilung der Sehkraft mittels Drohreaktion. Sämtliche anschließenden Untersuchungen fanden in einem abgedunkelten Raum statt, um durch die Ausschaltung störender Augenreflexe eine optimale Beurteilung zu erreichen (WALDE und SCHÄFFER, 2008). Die Patienten wurden durch die Abdunkelung weiterhin optisch ruhiggestellt, der Stress minimiert und eine partielle Weitstellung der Pupille (Mydriasis) erzielt. Die bei Eulen vorhandene Schreckmydriasis erleichterte zusätzlich die Untersuchung. Auf eine medikamentöse Weitstellung konnte gänzlich verzichtet werden. Die Patienten wurden durch eine fachkundige Person mittels einwickeln in ein Handtuch und Kappengriff fixiert. Bei schlechtem Allgemeinbefinden wurden die Untersuchungen fraktioniert durchgeführt.

Zur Beurteilung der **vorderen Augenkammer** kam eine Kowa SL-17 Spaltlampe (Fa. Kowa, Tokio, Japan) zum Einsatz mit drei verschiedenen Lichtintensitäten, integriertem Cobalt-Blaufilter, zwei verschiedenen Vergrößerungen (10-fach, 16-fach) und variierbaren Spaltbreiten (0,1, 0,2, 0,8 mm). Mit der runden Lichtquelle wurde das Vorhandensein des Pupillarreflexes überprüft. Dieser galt als positiv, wenn sich die Pupille auf den Lichtreiz hin zusammenzog. Zusätzlich wurde die runde Lichtquelle zur Betrachtung der vorderen Augenkammer im seitlich auffallenden und durchfallenden Licht genutzt. Dabei konnten eventuelle Trübungen der Hornhaut, Fremdkörper, Veränderungen der Iris oder pathologische Inhalte der vorderen Augenkammer, wie Hypopyon oder Hyphäma, erkannt werden. Mit dem einstellbaren Spalt wurde das Vorhandensein der drei Purkinje Sanson'schen Spiegelbilder überprüft. Dabei stellen die Reflexionen die Hornhautoberfläche, sowie die Linsenvorder- und -hinterfläche dar und geben Hinweise auf Linsenluxationen.

Die **hintere Augenkammer** wurde mittels indirekter Ophthalmoskopie evaluiert. Hierfür wurde das Kopfbandophthalmoskop Omega® 100 (Heine, Herrsching, Deutschland) verwendet. Das Gerät verfügt über drei verschiedene Lichtkegelgrößen und drei verschiedene Lichtfarben (weiß, blau und grün). Nach Aufsuchen des Fundusreflexes aus leicht dorsonasaler Blickrichtung wurde eine Linse von Double Aspheric (Fa. Volk Optical Inc. Mentor, USA,) vor das Auge positioniert. Mithilfe verschiedener Dioptrienzahlen der Linsen (30, 78 und 90 Dioptrien) war eine Anpassung an verschiedene Bulbusgrößen möglich. Je kleiner der Bulbus desto größer die erforderliche Brechkraft der Linse, sodass sich bei dem großen Bulbus der Greifvögel in der Regel eine Zahl von 30

Dioptrien bewährt hat. Bei Betrachtung des Augenhintergrunds wurde auf Unversehrtheit des Pecten oculis (z.B. Abrisse, Blutungen, Degeneration, Atrophien), Veränderungen der Retina (z.B. Ablösungen, Risse, Entzündungen) und auf unphysiologischen Inhalt des Glaskörpers (z.B. Fibrin, Einblutungen) geachtet.

In Einzelfällen wurde bei begründetem Verdacht auf Vorliegen eines Glaukoms oder Uveitis eine Messung des Augeninnendrucks mit einem TonoVet® (Fa. Acrivet, Heningsdorf, Deutschland) durchgeführt, sowie bei Verdacht auf Hornhautläsionen ein Fluoreszein-Test. Hierfür wurde ein Tropfen Thilorbin® (OmniVision GmbH, Puchheim, Deutschland) in jedes Auge appliziert und nach 30 Sekunden mit steriler Kochsalzlösung ausgespült. Bei Verletzungen der Kornea waren unter dem Blaulicht der Spaltlampe grün fluoreszierende Bereiche sichtbar. Bei jeglichen pathologischen Abweichungen wie beispielsweise abnormen Augeninnendruck, Linsentrübungen oder Hornhautdefekten wurde das Tier nicht mit in die Studie einbezogen.

3.2 OCT-Untersuchung

3.2.1 Das Gerät

Für die weiterführende Diagnostik mittels OCT wurde das Gerät SPECTRALIS® HRA+OCT der Firma Heidelberg Engineering (Heidelberg, Deutschland), wie in Abbildung 16 zu sehen, verwendet. Zur Einheit gehörten außerdem ein Transformator, ein Netzgerät sowie ein Computer mit zugehörigem Bildschirm.

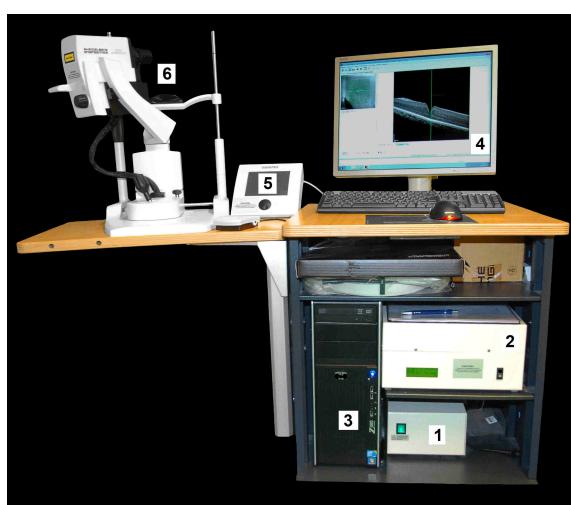


Abbildung 16: Aufbau SPECTRALIS® HRA+OCT

1 - Transformator, 2 - Netzgerät, 3 - Rechner, 4 - Bildschirm, 5 - Touchpad, 6 - SPECTRALIS Einheit

Das Gerät arbeitet mit der Technologie der SD-/FD-OCT. Hierfür verwendet es eine Superlumineszenzdiode mit einer zentralen Wellenlänge von 870 nm. SPECTRALIS® entsendet einen Doppelstrahl, wobei einer der beiden Lichtstrahlen stets den Fundus aufnimmt und diesen bei Augenbewegungen verfolgt. Dieses sogenannte TruTrack Active Eye Tracking führt zu einer Reduzierung von Bewegungsartefakten und ermöglicht genaue Folgeuntersuchungen, da die Lokalisation der Erstaufnahme exakt nachvollzierbar ist. Die Technologie ermöglicht zudem die Aufnahme mehrerer Bilder einer Stelle zur gleichen Zeit und unterdrückt somit Rauschen. Die Apparatur besteht aus einer Kinn- und Stirnstütze. Die Stirnstütze wurde für die Verwendung beim Vogel abgebaut. Die Kamera lässt sich über einen Joystick manövrieren. Dabei wird automatisch durch die Position der Kamera das untersuchte Auge erkannt (rechts, links). Bei einer mittigen Ausrichtung ertönt ein Warnsignal und das Auge muss manuell ausgewählt werden. Das Auslösen des Scans kann über die Bedienung eines Touchpanels oder mithilfe eines Fußschalters erfolgen. Über das Touchpanel werden weitere Einstellungsoptionen wie der Aufnahmemodus, die Laserintensität und der Scanwinkel ausgewählt. Im Aufnahmefenster, welches in Abbildung 17 dargestellt ist, ist auf der linken Seite die Fundusaufsicht zu sehen.

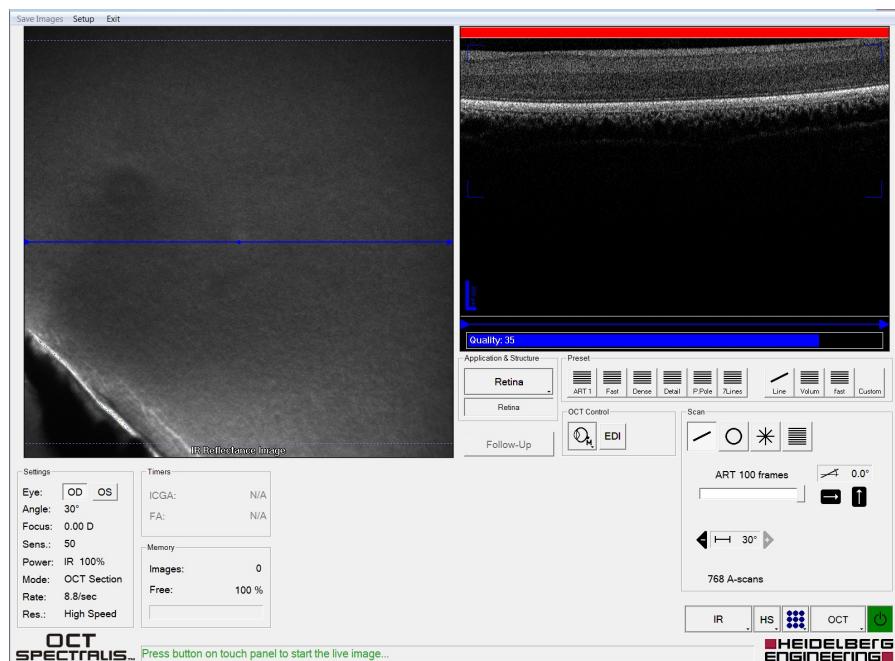


Abbildung 17: Aufnahmefenster des OCT-Geräts

Links: Fundusaufsicht eines Mäusebussards (*Buteo buteo*), als schwarze Struktur sichtbar in der linken unteren Ecke der Pecten oculi; Rechts: B-Scan sowie in blau darunter der Qualitätsbalken und verschiedene Einstellungsoptionen

Auf der rechten Seite befindet sich das OCT-Bild, der sogenannte B-Scan. Im oberen Drittel sind Markierungen für die Kennzeichnung des „Sweet Spots“ eingefügt. Die Retina sollte für eine bestmögliche Darstellung innerhalb dieses Bereiches aufgenommen werden, sowie im blauen Bereich des Qualitätsbalken unterhalb des Scans liegen. Im Aufnahmefenster lassen sich weiter verschiedene Einstellungsoptionen finden, wie die Augengröße (S-XL) und verschiedene Voreinstellungen des Scans (Fast, Dense, P.Pole, Lines, ART1). Die Durchführung der Aufnahmen erfolgt über die Software Heidelberg Eye Explorer (HEYEX).

3.2.2 Vorbereitungen

Vor der Untersuchung und der Handhabung des Patienten wurde das OCT-Gerät bereits hochgefahren und wichtige Patientendaten vermerkt (Veteranummer, Spezies, Geschlecht), sowie die Aufnahmeeinstellungen ausgewählt. Patienten die Schmerzsymptome äußerten oder bei denen von einem schmerhaften Zustand auszugehen war, erhielten vor der OCT-Untersuchung ein potentes Schmerzmittel (Butorphanol 4mg/kg KM). In allen Fällen wurde die Untersuchung wach durchgeführt. Eine Anästhesie hat nachweislich Einfluss auf den Augeninnendruck und könnte anschließende Vermessungen der Retina verfälschen (HAHNENBERGER, 1976; HOLVE et al., 2013). Eine Untersuchung am frischtoten Tier ist nicht möglich, da das Auge innerhalb weniger Minuten eintrübt und Hornhaut und Linse für die OCT undurchlässig werden (MCNABB et al., 2017). Für die Untersuchung war ein lockeres Einwickeln des Vogels in ein Handtuch durch den Untersucher selbst als Fixationsmaßnahme ausreichend. Der Kopf musste in der Regel nicht fixiert werden und das Tier konnte frei blinzeln. Somit war der natürliche Tränenfilm gegeben und ein zusätzliches Feuchthalten der Augen mittels steriler Kochsalzlösung nicht notwendig. Das Allgemeinbefinden und die Atmung konnten jederzeit vom Untersucher selbst registriert und kontrolliert werden. Die Aufnahmen erfolgten in einem abgedunkelten, ruhigen Raum, indem nur der Untersucher selbst anwesend war, um den Stress für das Tier auf ein Minimum einzuschränken. Durch die Abdunkelung des Raums war eine weitere medikamentöse Weitstellung der Pupille nicht notwendig. Bei Eulen trug zusätzlich die Schreckmydriasis zu einer guten Zugänglichkeit für die OCT bei. Zeigte der Vogel jegliche Anzeichen von hochgradigem Stress wie Schnabelatmung, Dyspnoe oder langanhaltende Abwehrbewegungen wurde die Untersuchung abgebrochen und unverzüglich die Euthanasie angeschlossen.

3.2.3 Aufnahme

Der in ein Handtuch locker eingewickelte Patient wurde mit einer Hand an den Ständern gehalten und mit der zweiten Hand am Brustkorb gestützt (siehe Abbildung 18).



Abbildung 18: Fixation eines Mäusebussards (*Buteo buteo*) für die OCT-Untersuchung

Die Kinnstütze diente ebenfalls als leichte Stütze für den Vogel. Das zu untersuchende Auge wurde fokussiert und der Vogel so nah an die Kamera herangeführt bis eine Fundusaufsicht in gewünschter Qualität sichtbar wurde. Der Einfallswinkel zum Auge wurde entsprechend so angepasst, dass die Zielstrukturen (Fovea centralis und Fovea temporalis) darstellbar waren. Die Augengröße S wurde für Turmfalken (*Falco tinnunculus*) und Sperber (*Accipiter nisus*) ausgewählt. Bei größeren Vertretern wie Mäusebussard (*Buteo buteo*) und Habicht (*Accipiter gentilis*) die Größe M. Eulen wurden mit der Größe L untersucht. Sämtliche Aufnahmen sind im Fastscan Modus aufgenommen worden, bei einer Laserintensität von 100 %, einem Focus von 0 D und einer Sensitivität von 48 - 50. Das Sichtfeld entsprach bei allen Aufnahmen 30 %. Bei jedem untersuchten Vogel wurde zunächst der Fundus großflächig mit der Echtzeitdarstellung abgefahren, ohne eine Aufnahme auszulösen, um mögliche pathologische Abweichungen festzustellen. Für die vergleichenden Vermessungen der einzelnen Retinaschichten wurden nur unveränderte, physiologische Augen mit einbezogen. War dies der Fall, wurde die Fovea centralis (außer bei Eulen) und die Fovea temporalis aufgenommen. Die genannten Bereiche wurden, wenn möglich, von jedem Auge zweimal gescannt.

3.2.4 Auswertung

Für die Auswertung wurde der Heidelberg Eye Explorer 1.10.2.0 verwendet, mit dessen Hilfe die Tiefe der Fovea centralis und temporalis sowie die einzelnen Schichtdicken bestimmt werden konnten. Jede Messung erfolgte zweimal an zwei verschiedenen Aufnahmen. Abbildung 19 zeigt die Bestimmung der Tiefe der Fovea auf, welche durch den Einzug einer Geraden durch die zwei höchsten Punkte der Areae foveae und ein Lotfällen im rechten Winkel zum tiefsten Punkt bestimmt wurde.

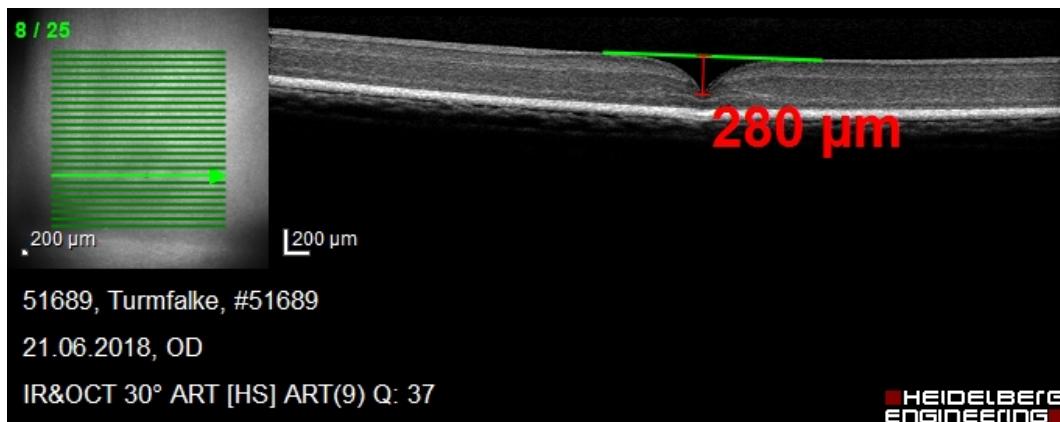


Abbildung 19: Bestimmung der Foveatiefe in der OCT

Einzug einer Geraden durch die zwei höchsten Punkte der Fovea und Lotfällen zum tiefsten Punkt

Da die Retinaschichten bekannterweise topografische Variationen aufweisen, ist es wichtig die Messungen sowohl innerhalb der OCT-Aufnahme als auch in der Konfokalmikroskopie zu vereinheitlichen. Es müssen somit Orientierungspunkte gewählt werden. Bei Säugetieren fungieren hierfür die Gefäße der Retina als eine Art Landkarte. Da Vögel jedoch keine retinalen Gefäße besitzen ist dies nicht möglich. Aus diesem Grund wurde als Orientierungspunkt die Fovea centralis gewählt. In der konfokalmikroskopischen Aufnahme wurden zwei Messpunkte (jeweils nasal und temporal) festgelegt und der Abstand zur Fovea bestimmt. Der gemessene Abstand konnte dann für die OCT-Aufnahme übertragen und so der Messpunkt wiedergefunden werden (siehe Abbildung 20, S. 39).

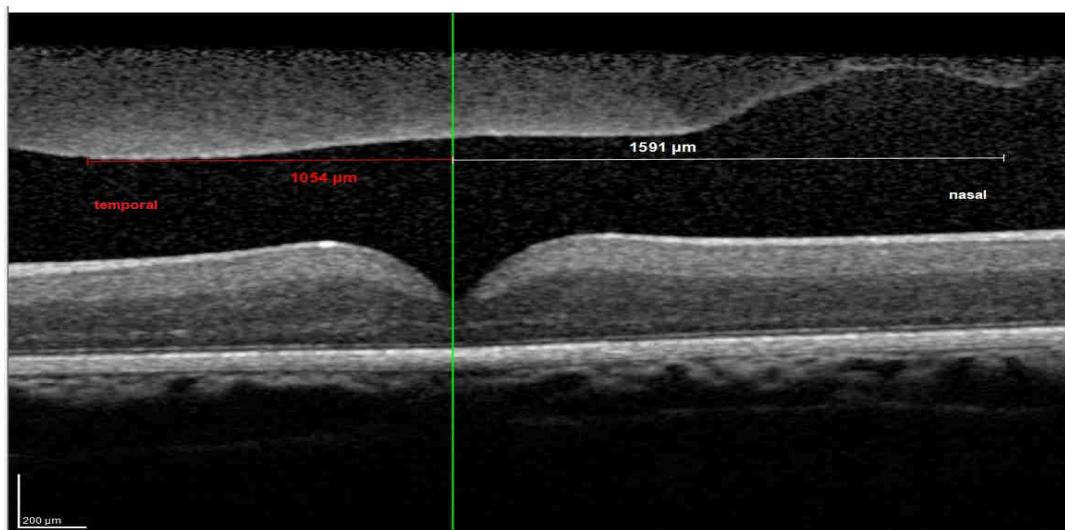


Abbildung 20: Bestimmung der Messpunkte in der OCT

Übertragung des in der Konfokalmikroskopie gemessenen Abstands zum Zentrum der Fovea centralis in nasaler und temporaler Richtung

Die einzelnen Schichtdicken wurden auf diesem Wege jeweils nasal und temporal der Fovea centralis bestimmt. Dabei wurden die Messungen nur an Schichten durchgeführt, an denen die Grenzen genau bestimmt werden konnten. Die OCT-Aufnahme stellte hierbei den limitierenden Faktor dar, sodass einige Schichten zusammen vermessen werden mussten (siehe Abbildung 21). In die Gesamtdicke der Retina wurden das OS der Zapfenschicht und das RPE nicht miteinbezogen.

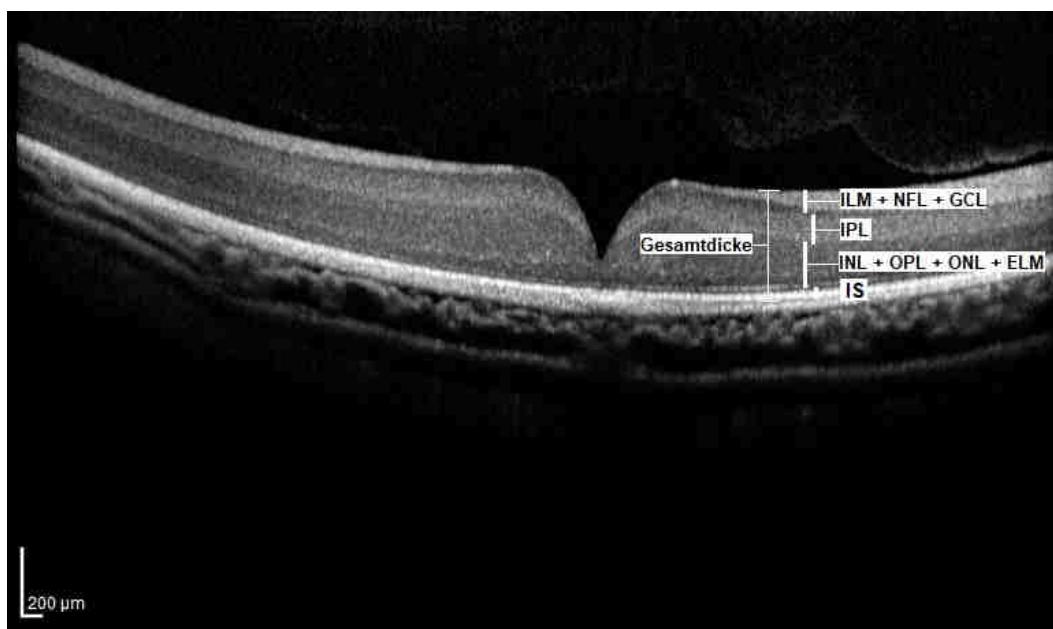


Abbildung 21: Vermessung der Retinaschichten in der OCT

Retina eines Sperbers (*Accipiter nisus*); Schicht 1: ILM+NFL+GCL, Schicht 2: IPL, Schicht 3: INL+OPL+ONL+ELM, Schicht 4: IS der Zapfenschicht; Gesamtdicke (ohne OS und RPE)

Zeigten die Schichten am Messpunkt bedingt durch die physiologische Form des Bulbus eine starke Krümmung auf, wurden Hilfslinien eingezeichnet um die Schichtdicken einheitlich in einem 90° Winkel bestimmen zu können (siehe Abbildung 22).

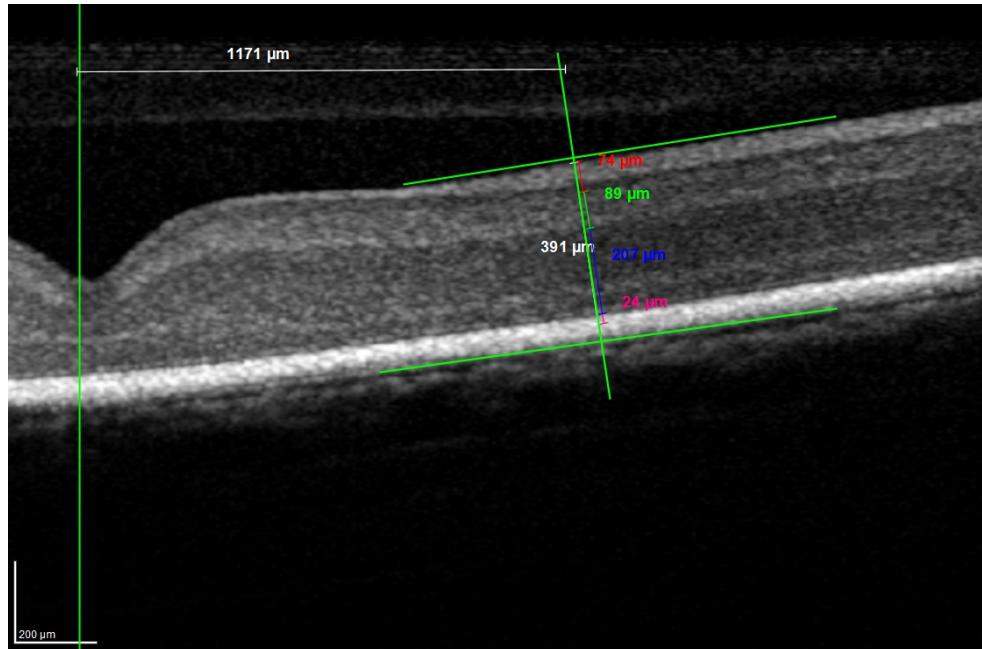


Abbildung 22: Bestimmung der Schichtdicken

Einzug von Hilfslinien (grün) zur einheitlichen Schichtdickenmessung im rechten Winkel

Längenmessungen innerhalb der OCT-Aufnahme beruhen auf der Annahme eines Gullstrand-Auges (vereinfachtes menschliches Modellauge mit durchschnittlichen und vereinheitlichten optischen Werten) sowie auf den eingestellten Kornearadius und Fokus. Dabei veränderten sich bei Anpassung dieser Parameter die horizontalen Messwerte (Abstandsmessungen zur Fovea). Vertikale Messungen (Messung Schichtdicken) blieben unverändert. Bei jeder Aufnahme wurde somit auf einen korrekt eingestellten Fokus geachtet und der Kornearadius für jedes Tier entsprechend angepasst. Um Messungenauigkeiten zu vermeiden, wurden sämtliche Messungen in der μm-Skalen-Ansicht durchgeführt (siehe Abbildung 23 und Abbildung 24, S. 41).

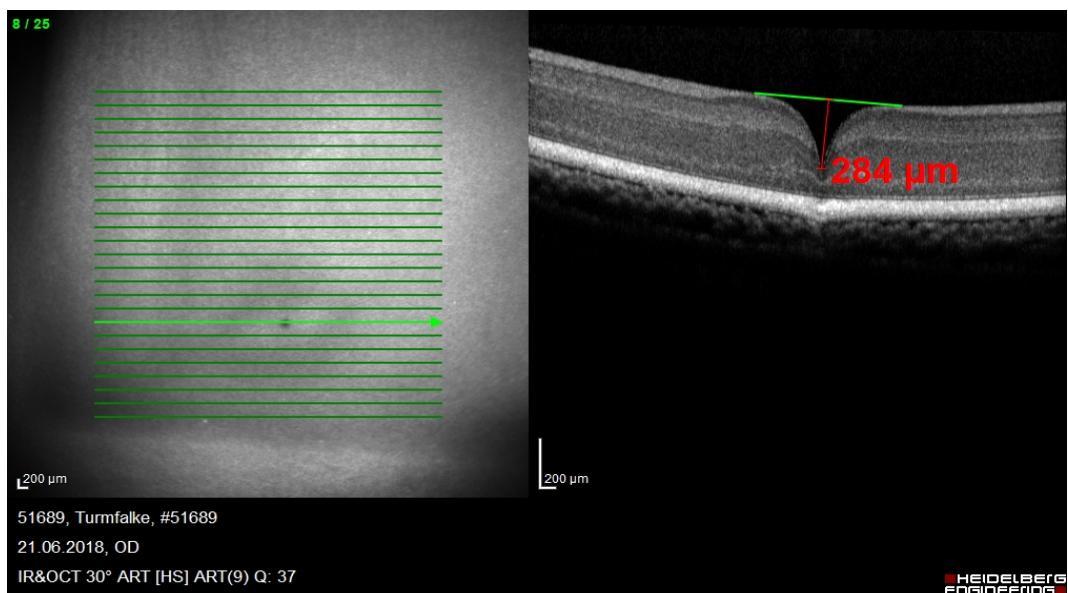


Abbildung 23: Darstellung der OCT-Aufnahme und Bestimmung der Foveatiefen in Pixel

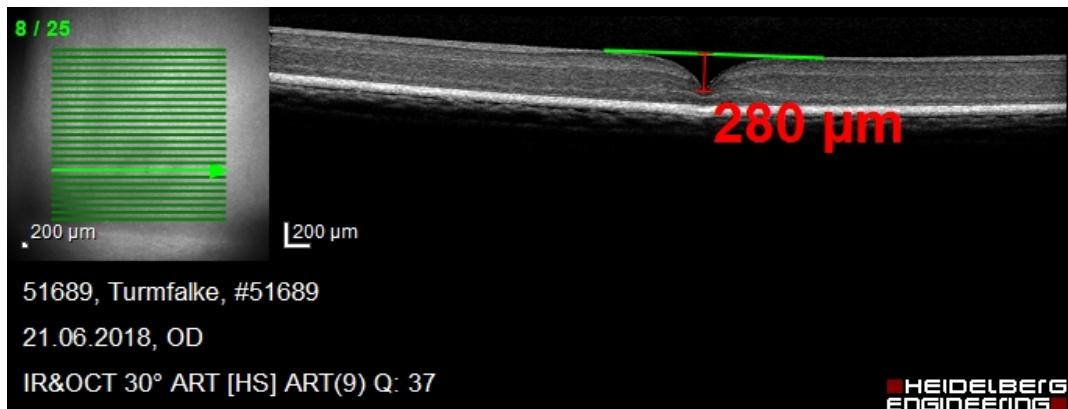


Abbildung 24: Darstellung der OCT-Aufnahme und Bestimmung der Foveatiefen in µm

3.3 Histologische Untersuchung

3.3.1 Euthanasie

Aufgrund der infausten Prognose aller Patienten und der damit fehlenden Rehabilitierbarkeit in die freie Wildbahn, schloss sich in sämtlichen Fällen für die vergleichenden Vermessungen der Retina nach der OCT-Untersuchung die Euthanasie an. Die Euthanasie fand unter Allgemeinanästhesie mit 5 % Isofluran (IsoFlo®, Albrecht, Aulendorf, Deutschland) statt. Sobald das chirurgische Toleranzstadium erreicht worden ist, erfolgte in der Regel eine intravenöse Injektion mit T61 (MSD Animal Health, Deutschland). War eine intravenöse Injektion nicht möglich, wurde die intrakardiale Applikation gewählt.

3.3.2 Entnahme der Bulbi

Nach der Euthanasie erfolgte unverzüglich die Entnahme der Bulbi um Veränderungen aufgrund von Autolyse, Anoxie und Zusammenfall des Augeninnendrucks zu verhindern. Mithilfe einer geraden Klemme wurde das Auge an beiden Lidern fixiert. Mit einem Skalpell erfolgte im periokulären lateralen Augenwinkel eine vorsichtige Inzision durch die Haut und Sklera, ohne dabei den Augapfel zu verletzen. Die Inzisionsstelle diente zum Einführen einer stumpfen, gebogenen Metzenbaumschere, mit deren Hilfe das Auge anschließend kreisrund umschnitten wurde. Zur Lösung des hinteren Teils des Bulbus aus der Augenhöhle, war die Schere durch ihre gebogene Form besser an die Form des Augapfels angepasst und die Augenmuskulatur konnte vorsichtig ab präpariert, sowie der Sehnerv final durchtrennt werden. Während des gesamten Vorgangs wurde Wert darauf gelegt, so wenig Druck und Zug wie möglich auf das Auge auszuüben um artifiziellen Retinaablösungen entgegen zu wirken. Anhaftendes Gewebe wie Reste des Sehnervs, Augenmuskeln und Augenlider wurden möglichst vollständig entfernt, um einen negativen Einfluss auf die Fixierung zu vermeiden. Zur Bestimmung eines Schrumpfungsfaktors wurde das Auge vor und nach der Fixierung mithilfe einer Präzisionswaage gewogen und mit einem digitalen Messschieber der Korneadurchmesser vermessen.

3.3.3 Fixation der Retina

Das Auge wurde im Ganzen und durch Einbringen der Fixierlösung über Parazentese in das Augeninnere fixiert, um eine Faltenbildung der Retina zu verhindern (RAVELHOFER, 1996). Gleichzeitig wurde hierdurch eine schnelle und gleichmäßige Verteilung der Fixierlösung in das Gewebe ermöglicht. Für einen optimalen Erhalt der Retinamorphologie wurde zur Fixierung Davidsonlösung verwendet (LATENDRESSE et al., 2002). Die verwendete Davidsonlösung bestand aus folgenden Komponenten:

Formalin 37 %	54 ml
Vollentsalztes (VE) Wasser	146 ml
Einstellung des pH-Wertes auf 7	
Ethanol 96%	350 ml
VE-Wasser	350 ml
Eisessig	100 ml

Nach einer Fixationszeit von mind. 24 h wurde das Auge in das vordere und

hintere Augensegment getrennt und für weitere 24 h in frischer Davidsonlösung fixiert.

3.3.4 Kalottierung

Für die Trennung des hinteren Augensegments vom Vorderen wurde zuerst, wie in Abbildung 25 zu sehen, die Kornea mit einer Skalpellklinge entfernt und mit einer stumpfen Schere ein Schnitt in das hintere Augensegment ziehend gesetzt. In diesen Einschnitt konnte eine stumpfe Schere eingeführt werden. Die vordere Augenkammer wurde auf diesem Wege mithilfe der Schere vom hinteren Teil samt Linse abgesetzt.

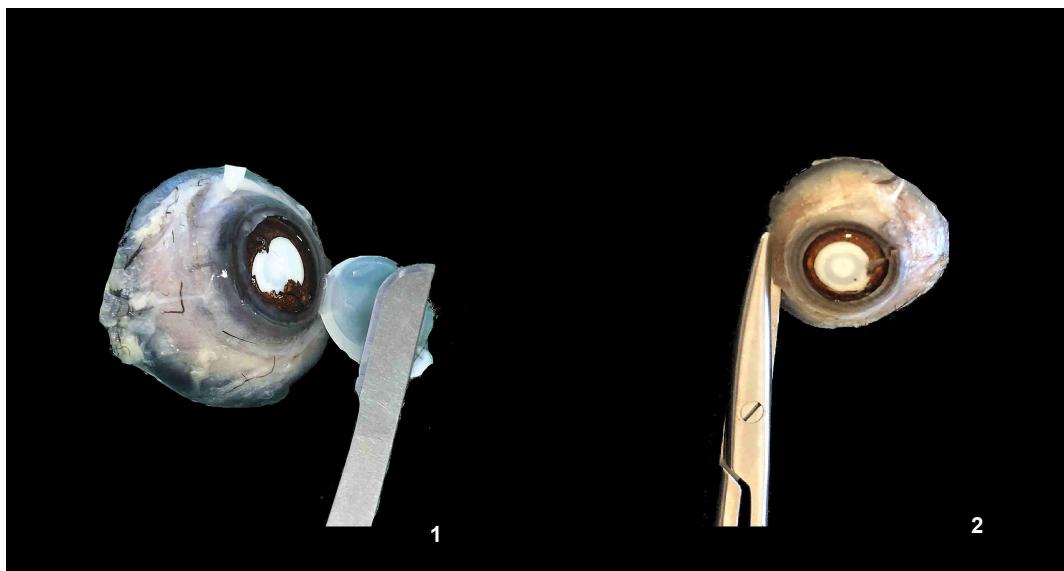


Abbildung 25: Kalottierung des Bulbus

Asetzen der Kornea mit einer Skalpellklinge und der vorderen Augenkammer mithilfe einer stumpfen, gebogenen Schere

Reste des Glaskörpers wurden vorsichtig mit einer anatomischen Pinzette und einem feinen Pinsel entfernt, ohne hierbei die Retina zu berühren. Das hintere Augensegment wurde so zurechtgeschnitten, dass beide Foveae erhalten blieben (siehe Abbildung 26).

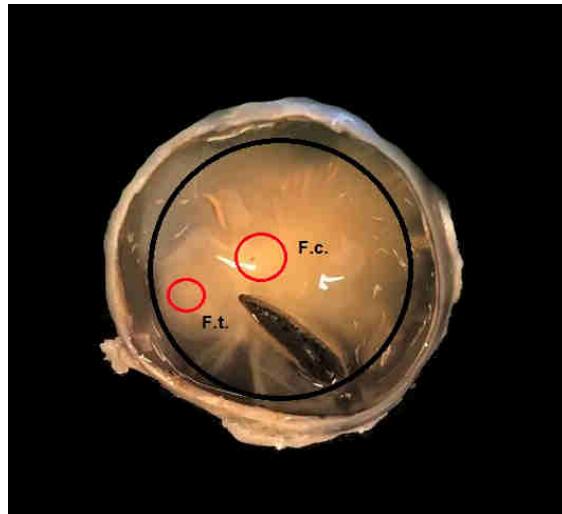


Abbildung 26: Zurechtschneiden der Probengröße

Makroskopisch sichtbar sind beide Foveae: F.c. - Fovea centralis, F.t. - Fovea temporalis. Der schwarze Kreis zeigt den Zuschnitt an

3.3.5 Vorbereitung der Probe

Für die Vorbereitung zur Immunhistochemischen Färbung wurden die hinteren Augensegmente mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) zweimal 10 Minuten und einmal eine Stunde lang ausgewaschen, um die Davidsonlösung zu entfernen. Die PBS-Lösung wurde dabei wie folgt angesetzt:

Natriumchlorid (NaCl) 200 g

Kaliumchlorid (KCl) 5 g

Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$) 36 g

Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) 5 g

in 2,5l vollentsalztes Wasser

Einstellung auf pH 7,4 mit Natriumhydrogencarbonat (NaOH)

Für die weitere Vorbereitung wurde die Kryoschnitttechnik angewandt. Das heißt, die Proben werden gefroren und anschließend an einem gekühlten Mikrotom (Kryostat) in der gewünschten Größe geschnitten. Auf diese Weise wird die Antigenität optimal und besser erhalten, als beispielsweise bei der Paraffineinbettung. Beim Einfrieren von wasserhaltigem Gewebe kommt es

unweigerlich zur Bildung von Eiskristallen, die die Morphologie negativ beeinflussen. Ziel ist es demnach die Bildung dieser so klein wie möglich zu halten. Dies wird durch eine möglichst schnelle Abkühlung erreicht oder durch die Verwendung von Gefrierschutzmitteln (LANG, 2013; MULISCH et al., 2015). In der Studie erfolgte das Einlegen in 30 % Sucrose in PBS über Nacht um Gefrierartefakte durch die Kryo-Einbettung zu vermeiden. Innerhalb dieser Zeit sind sämtliche Proben, unabhängig der Größe, zum Boden des Gefäßes abgesunken. Für die Einbettung wurden die Proben in Einbettformen mit Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound (Sakura Finetek, Kalifornien, USA) als Einbettmedium entsprechend ausgerichtet. Das Medium ist wasserlöslich und löst sich während des Färbevorgangs. Im Anschluss wurden die Proben samt Form und Medium bei $\leq -60^{\circ}\text{C}$ in einem Isopentanbad umgeben von Trockeneis gefroren (siehe Abbildung 27). Der Probenblock war je nach Probengröße nach circa 5 Minuten durchgefroren und konnte entnommen werden. Luftdicht verpackt waren diese bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung lagerfähig. Für die histologische Untersuchung wurden am Kryostat Leica CM1950 (Leica, Wetzlar, Deutschland), nach einer Temperierung der Proben, 25 μm dicke Retinaschnitte angefertigt bei einer KammerTemperatur von $-19/20^{\circ}\text{C}$ und einer MesserTemperatur von -21°C . Die Probenblöcke wurden bis zum Ende der Pectenspitze getrimmt und anschließend jeder 3./4. Schnitt auf einen Objektträger aufgefangen, um den Beginn der Fovea zu lokalisieren.

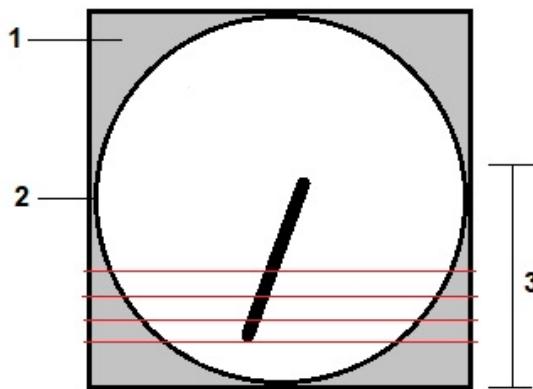


Abbildung 27: Ausrichtung der Probe in der Einbettform

1 - mit Einbettmedium gefüllte Form; 2 - hinteres Augensegment mit der Pectenbasis zum Messer des Kryostats ausgerichtet; 3 - Bereich der Trimmung bis zum Ende der Pectenspitze; Die roten Linien stellen die Schnittrichtung am Kryostaten dar.

Schnitte, die den Bereich der Fovea aufzeigten, wurden auf Poly-L-Lysin-beschichtete (Poly-L-Lysin; PB890, Sigma-Aldrich/Merck KGAA, Darmstadt, Deutschland) Objekträger übertragen. Hierfür wurden die Objekträger mit Aceton gereinigt, getrocknet und für fünf Minuten in einer 1:10 verdünnten (mit Aqua dest.) Polylisinlösung inkubiert. Nach einer Trocknung über Nacht konnten diese dann verwendet werden. Die Kryoschnitte wurden nach dem Auffangen mind. 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend ebenfalls bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.3.6 Markierung mit Antikörpern

Die gefrorenen Schnitte wurden langsam temperiert und durch eine zweimalige Waschung in PBS wieder in ein wässriges Medium überführt. Für die Immunhistochemische Färbung wurde sich an der Arbeit von RAUSCHER et al. (2013) orientiert. Um unspezifische Bindungen zu verhindern wurde 5 % normal Donkey Serum (DOS; D9663, Sigma-Aldrich/Merck KGAA, Darmstadt, Deutschland) mit 1 % Dimethylsulfoxid (DMSO; 1.02952.1011, Merck KGAA, Darmstadt, Deutschland) und 0,3 % Triton X-100 (T8787, Sigma-Aldrich / Merck KGAA, Darmstadt, Deutschland) als Blockierlösung verwendet. Als primärer Antikörper zur Darstellung der Müllergliazellen wurde ein monoklonaler Anti-Glutamin-Synthetase-Antikörper aus der Maus (MAB302, Merck KGAA, Darmstadt, Deutschland) genutzt. Zur Markierung der Zapfen kam das Lektin PNA (Peanut Agglutinin; L6135, Merck KGAA, Darmstadt, Deutschland) zum Einsatz. Für alle tagaktiven Greifvögel wurde eine Verdünnung des primären Antikörpers Anti-Glutamin-Synthetase von 1:600 etabliert, für alle Nachtaktiven eine Verdünnung von 1:800. Bei dem Lektin PNA zur Markierung der Zapfen, welche bei den tagaktiven Vögeln zahlreicher vorhanden sind, ist eine Verdünnung von 1:200 ausreichend. Bei den Nachtaktiven ist eine Verdünnung von 1:100 notwendig. Anti-Glutamin-Synthetase und PNA wurden zusammen mithilfe der Blockierlösung entsprechend verdünnt. Nach einer Inkubation mit diesem Gemisch für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur (26 °C), erfolgte eine weitere Inkubation bei +4 °C über Nacht. Überschüssige Antikörper und überschüssiges Lektin wurden anschließend durch eine dreimalige Waschung in PBS abgespült. Zur Visualisierung des primären Antikörpers wurde der 2. Antikörper Donkey anti-Mouse IgG (H+L), konjugiert mit Alexa Fluor® 594 (2 mg/ml, 1:200, A21203, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Für das Lektin kam ein mit Alexa Fluor 488 konjugiertes Streptavidin (1 mg/ml, 1:100, S11223, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) zum Einsatz. Die Inkubation der 2. Antikörper erfolgte für eine Stunde bei

Raumtemperatur (26 °C), bevor sich eine erneute Spülung mit PBS anschloss. Im letzten Schritt erfolgte die Zellkernfärbung mit Hoechst 33258 (bisBenzimide H 33258; 14530, Sigma-Aldrich / Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und eine finale Waschung mit destilliertem Wasser (Aqua dest.). In der Studie zeigte sich eine starke Autofluoreszenz der Retina, sodass sämtliche Schnitte vor der gesamten Prozedur für mindestens 12h Stunden einer Aquariumlampe ausgesetzt wurden, um die Autofluoreszenz zu unterdrücken (NEUMANN und GABEL, 2002). Damit es währenddessen nicht zur Austrocknung der Schnitte kam, wurden sie in 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,8 (12,114g Tris, 900 ml Aqua dest., Einstellung auf pH 8,8 mit 1M HCl) überführt und während des Vorgangs gekühlt

Das Färbeprotokoll im Detail stellte sich zusammenfassend wie folgt dar:

1. Bestrahlung der Schnitte über Nacht in Tris-HCl-Puffer
2. 2 x 5 min spülen in PBS
3. Inkubation mit Blockierlösung: 5 % DOS + 1 % DMSO + 0,3 % Triton X-100 für 30 min in feuchter Kammer bei Raumtemperatur (26 °C)
4. Inkubation mit einem Gemisch aus Anti-Glutamin-Synthethase und PNA angesetzt in der Blockierlösung (siehe Punkt 3) für 1 h in feuchter Kammer bei Raumtemperatur (26 °C), anschließend über Nacht bei +4 °C
5. 3 x 10 min spülen in PBS
6. Inkubation in einem Gemisch aus donkey-anti-mouse-Alexa Fluor 594 und Streptavidin-Alexa Fluor 488 angesetzt in Blockierlösung (siehe Punkt 3), 1 h bei Raumtemperatur (26 °C)
7. 2 x 10 min spülen in PBS
8. Kernfärbung mit Hoechst 33258 für 10 min
9. 2 x 5 min spülen in Aqua dest.
10. Eindecken mit Shandon Immu-Mount

Nach der erfolgreichen immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte mittels Shandon Immu-Mount (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) eingedeckt und anschließend lichtgeschützt im Kühlschrank gelagert.

3.3.7 Konfokalmikroskopische Aufnahme

Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen erfolgten innerhalb einer Woche nach der abgeschlossenen Färbung und wurden schnellstmöglich durchgeführt, da nach einiger Zeit die Autofluoreszenz der Retina wiedereinsetzte. Für die Aufnahmen wurde ein OLYMPUS BX51WI Mikroskop mit OLYMPUS BX-DSU und SOLA LED Lampe (Olympus; Tokio, Japan) verwendet. Das Gerät arbeitet mit einer sogenannten DSU - Disk Spinning Unit, und bedient somit die Methode einer sich rotierenden Scheibe, erreicht Wellenlängen zwischen 350 bis 700 nm und benötigt pro Aufnahme weniger als 33 msec. Weiterhin wurde ein 20-fach vergrößerndes UPlanSApo Objektiv (Olympus; Tokio, Japan) verwendet und eine QImaging RETIGA 2000R Farbkamera (QImaging, Scientific Imaging Made Easy; Surrey, Canada). Stereoinvestigator 11.02.01 (MBF Bioscience, Williston, USA) wurde als Software zur Durchführung der Aufnahmen eingesetzt. Von den erfolgreich immunhistochemisch gefärbten Retinaschnitten wurde jeweils die Fovea sowie ein ausreichend großer Bereich nasal und temporal als 3D Scan festgehalten. Der entsprechende Scan-Bereich wurde im Präparat markiert, das obere und untere Ende der 25 µm dicken Schnitte festgelegt und ein Abstand von einem Mikrometer zwischen den einzelnen Scan-Ebenen gewählt. Alle DSU-Scans wurden mit jeweils drei Fluoreszenzfiltern als einzelne schwarz-weiß-Aufnahmen durchgeführt (Alexa 594, Alexa 488, Alexa 350) und anschließend durch die Software automatisch zu einem dreifarbigem 3D-Datensatz kombiniert.

3.3.8 Auswertung

Die Aufnahmen wurden mittels der Stereo Investigator Software 11.02.01 (MBF Science, Williston, USA) ausgewertet. Da die Aufnahmen mit derselben Software stattgefunden haben, wurden die Maßstäbe des Bildes automatisch erkannt und Messwerte konnten direkt übernommen werden, ohne dass eine Skalenanpassung notwendig war. Bei der Auswertung wurde Wert darauf gelegt, dieselben Verfahrensweisen wie bei der Auswertung der OCT-Bilder anzuwenden. Das heißt die Tiefe der Fovea wurde ebenfalls durch den Einzug einer Geraden durch die zwei höchsten Punkte und ein Lotfällen zum tiefsten Punkt bestimmt (siehe Abbildung 28, S. 49).

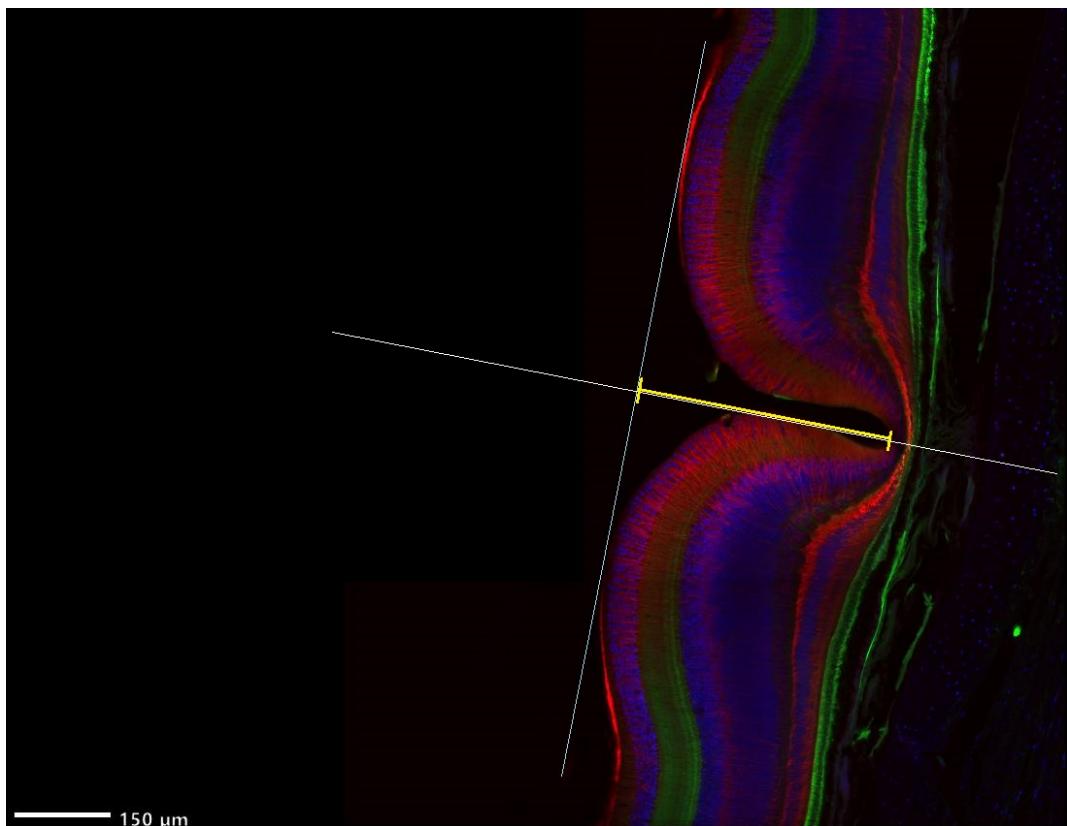


Abbildung 28: Bestimmung der Foveatiefen in der CLSM

Weiter wurden in der konfokalmikroskopischen Aufnahme die temporale und nasale Richtung bestimmt sowie jeweils ein Messpunkt nasal und temporal festgelegt (siehe Abbildung 29).

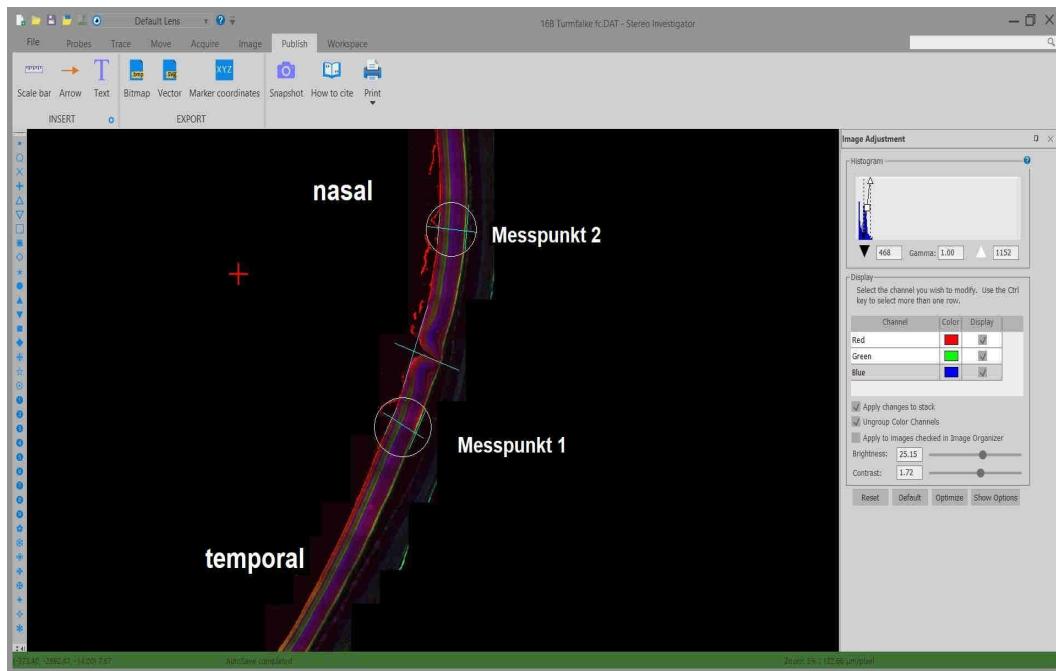


Abbildung 29: Auswertung der CLSM-Aufnahmen mithilfe der Stereo Investigator Software
Bestimmung der Foveatiefen und jeweils eines Messpunktes in nasaler und temporaler Richtung

Für den nasalen und temporalen Messpunkt wurde eine Stelle gewählt an denen die Retinaschichten möglichst parallel zueinander verlaufen, Hilfslinien verwendet und die Messungen dann ebenfalls im rechten Winkel mithilfe der Measure Line vorgenommen. Die Schichten wurden wie folgt vermessen: Die ILM zusammen mit der NFL und GCL, die IPL, die INL mit der OPL, der ONL und der ELM, das IS der Zapfenschicht und die Gesamtdicke aller Schichten (exklusive OS und RPE) (siehe Abbildung 30).

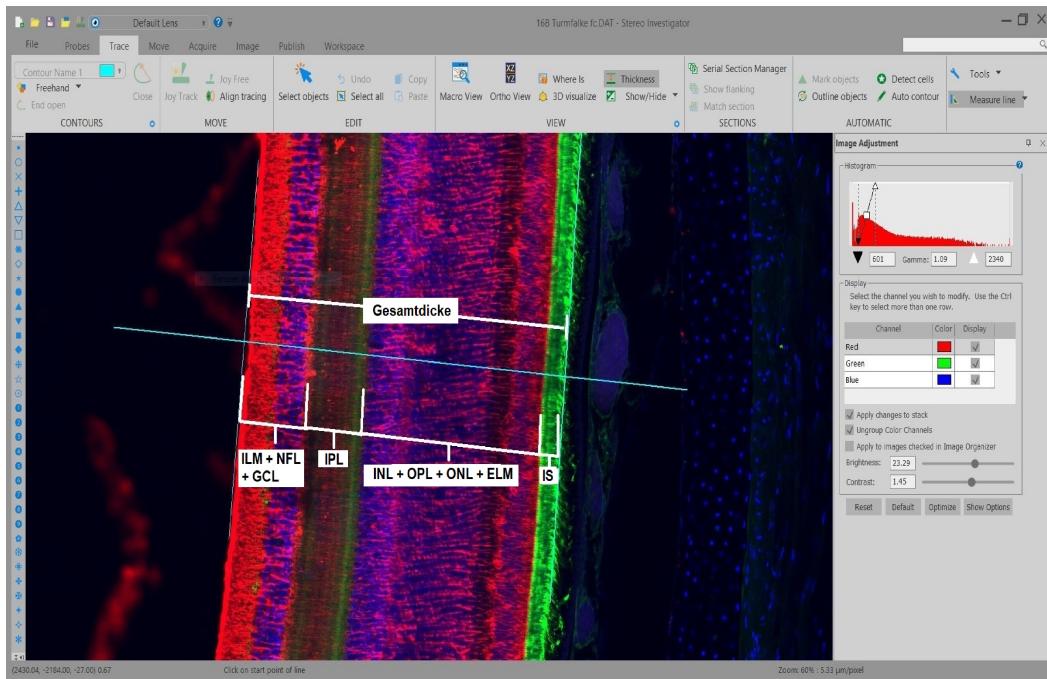


Abbildung 30: Vermessung der Retinaschichten in der CLSM

Schicht 1: ILM + NFL + GCL; Schicht 2: IPL; Schicht 3: INL + OPL + ONL + ELM; Schicht 4: IS

Um die einzelnen Schichtgrenzen exakt definieren zu können und somit möglichst genaue Messwerte zu generieren, konnten mithilfe der Software die Farbkanäle nachträglich angepasst und die Schichten mithilfe des 3D-Scans in der Tiefe nachverfolgt werden. Jeder Messwert wurde dreimal bestimmt und der Mittelwert tabellarisch festgehalten.

3.4 Fotografische Dokumentation

Für die Veranschaulichung der Untersuchungsgänge wurde eine Nikon D90 Digitalkamera mit einem Nikon DX AF-S NIKKOR 18-105 mm Objektiv (Nikon Corp., Japan) verwendet. Für die Bildbearbeitung fanden die Programme GIMP 2.8.22 und Adobe® Photoshop CC 2019 Anwendung.

IV. ERGEBNISSE

4.1 Fixationsmethode

Um die bestmögliche Fixierung für den Erhalt der Retina zu wählen, wurden die zwei geläufigsten Fixative verglichen: Formalin und Davidson. Formalin fixierte Proben zeigten häufiger Retinaablösungen. Die einzelnen Retinaschichten waren teilweise degeneriert und die Morphologie somit nicht ausreichend erhalten. Zudem hielten die Schnitte schlechter auf den Objektträgern. Die Fixierung eines bereits in das vordere und hintere Augensegment kalottierten Auges, sowie ein Einschnitt in den Limbus, um die Diffusion des Fixativs zu beschleunigen, führten stets zu einer hochgradigen Faltenbildung und Ablösung der Retina. Ein bloßes Eintauchen des Auges in die Fixierlösung ohne eine Diffusionserleichterung, führte ebenfalls zu diesem Bild. Auf diese Weise fixierte Proben waren nicht auswertbar. Ein zusätzliches Einbringen des Fixativs in das Augeninnere über eine Parazentese war somit zwingend notwendig. Dabei variierte das nötige Parazentesevolumen zur Vermeidung einer Fältelung der Retina innerhalb derselben Vogelart. Selbst die Verwendung des gleichen Volumens am rechten und linken Auge desselben Tieres, führte oftmals zu abweichenden Ergebnissen. Im Durchschnitt stellte sich gar keine bis geringgradige und vereinzelt mittelgradige Fältelung der Retina dar. Die Tabelle 2 zeigt die applizierten Parazentesevolumina auf, welche zu einem guten Erhalt der Retinamorphologie führten.

Tabelle 2: Parazentesevolumina zur Fixation

Art	Parazentesevolumen in ml
Turmfalke (<i>Falco tinnunculus</i>)	0,2 - 0,4
Sperber (<i>Accipiter nisus</i>)	0,2
Mäusebussard (<i>Buteo buteo</i>)	0,6 - 0,7
Habicht (<i>Accipiter gentilis</i>)	0,5 - 0,7
Waldkauz (<i>Strix aluco</i>)	0,8
Waldooreule (<i>Asio otus</i>)	0,4

Die Augen wurden für mindestens 24 Stunden bis zur Kalottierung fixiert und maximal 30 Tage lang. Dabei konnte kein Einfluss der Fixationszeit auf die anschließende Verarbeitung und Färbung der Schnitte beobachtet werden.

Um den Einfluss der Fixation auf die Schrumpfung des Gewebes bestimmen zu können, wurden die Augen nach der Parazentese und dem Einlegen ins Fixativ, sowie kurz vor der Entnahme zur Kalottierung, gewogen. Zusätzlich wurde der Korneadurchmesser vor und nach der Fixierung bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden mit der MedCalc Statistical Software Version 18.11.6 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2019) ausgewertet. Die Messwerte wurden in einem Bland-Altman-Diagramm dargestellt (siehe Abbildung 31 und Abbildung 32, S. 52-53) (ALTMAN und BLAND, 1983).

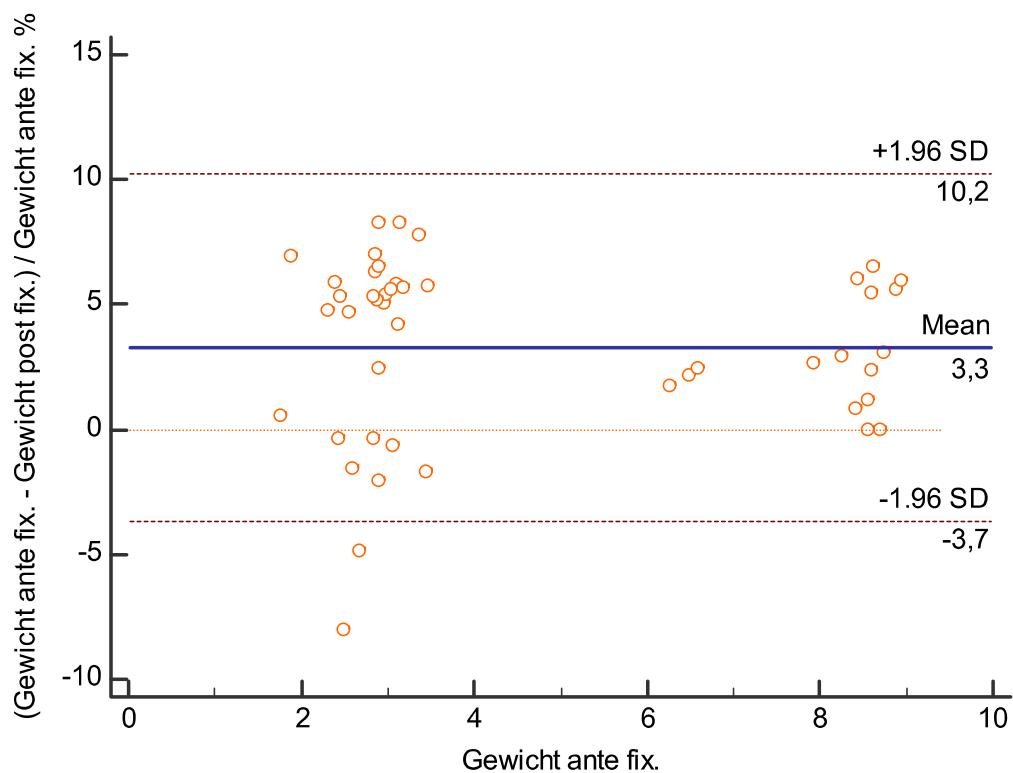


Abbildung 31: Gewicht der Augen vor (ante) und nach (post) der Fixation

Das Gewicht (gemessen in Gramm) vor der Fixation ist der tatsächliche Wert, sodass die Differenz beider Werte für das Gewicht vor und nach der Fixierung (y-Achse) in Abhängigkeit zum Gewicht vor der Fixation (x-Achse) in Prozent (%) dargestellt ist. Im Idealfall, wenn keine Veränderung des Gewichts durch die Fixation eintritt, ist die Differenz gleich Null (Nulllinie: rot gestrichelte Linie). Die blaue Linie zeigt den Mittelwert (Mean) an.

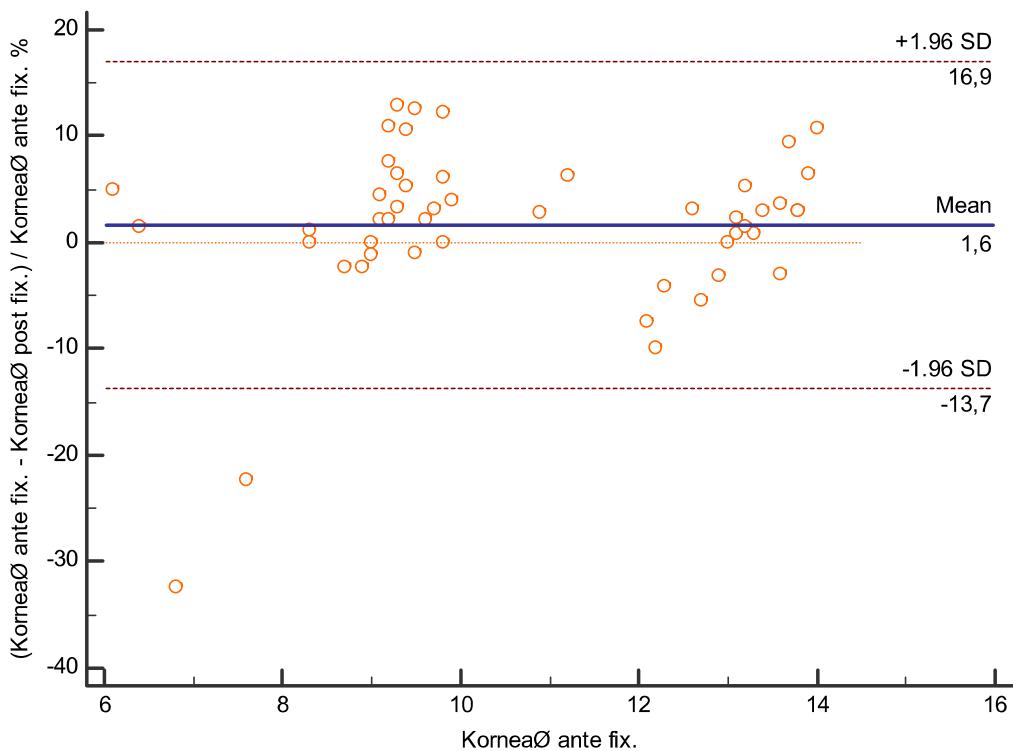


Abbildung 32: Korneadurchmesser vor (ante) und nach (post) der Fixation

Die Differenz des Korneadurchmessers (gemessen in Millimeter) (vor und nach der Fixierung) ist in Abhängigkeit vom Korneadurchmesser vor der Fixierung in Prozent (%) (x-Achse) aufgetragen.

Das Streudiagramm ergab für das Gewicht der Proben einen positiven Mittelwert von 3,3. Das bedeutet die Proben waren im Mittel 3,3 % leichter nach der Fixation. Der Korneadurchmesser war durchschnittlich 1,6 % größer vor der Fixation.

4.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung

Von insgesamt 27 Tieren wurden 50 Augen fünf verschiedener Arten aus drei Ordnungen fixiert. Davon konnte bei 30 Augen mindestens eine Fovea mikroskopisch aufgefunden werden. Insgesamt waren die Retinaschnitte sehr fragil und lösten sich leicht von den Objektträgern. Die Verwendung von Superfrost®Plus Adhäsionsobjektträgern (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), welche durch eine positive Ladung zu einer besseren Gewebeadhäsion führen, sowie mit 5 %iger Gelatine beschichtete Objektträger, führten zu keiner ausreichenden Haftung. Eine Poly-L-Lysinbeschichtung erzielte eine zufriedenstellende Adhäsion. Bei den durchgeführten Negativkontrollen (Inkubation mit 5 % normal Donkey Serum) zeigten die Schnitte eine sehr stark ausgeprägte Autofluoreszenz. Eine Bestrahlung der Schnitte für 30 Minuten,

einer Stunde oder zwei Stunden brachte keine Besserung. Erst eine Bestrahlung über Nacht unterdrückte die Autofluoreszenz für ungefähr eine Woche. Dabei blieb die Adhäsion der Proben auf den Objektträgern besser erhalten, wenn während der Bestrahlung eine Kühlung stattfand (NEUMANN und GABEL, 2002). Eine übermäßige Erwärmung führte zu einer leichteren Ablösung in den folgenden Schritten. Eine Vorbehandlung der Schnitte zur Demaskierung der Antigene fand nicht statt, da keine Notwendigkeit bestand und sich eine Vorbehandlung als nicht praktikabel erwies. Der experimentelle Einsatz von Hitze zur Antigendemaskierung führte zum Verlust der ohnehin fragilen Schnitte und zur Zerstörung der Retinamorphologie.

Für die Etablierung einer immunhistochemischen Färbung an der aviären Retina wurden Verdünnungsreihen des primären Antikörpers Anti-Glutamin-Synthetase und des Lektins PNA, sowohl bei einem Sperber als tagaktivem Vertreter und bei einem Waldkauz als nachaktivem Vogel, durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33, Abbildung 34, Abbildung 35 und Abbildung 36, Seite 54-55 zu sehen.

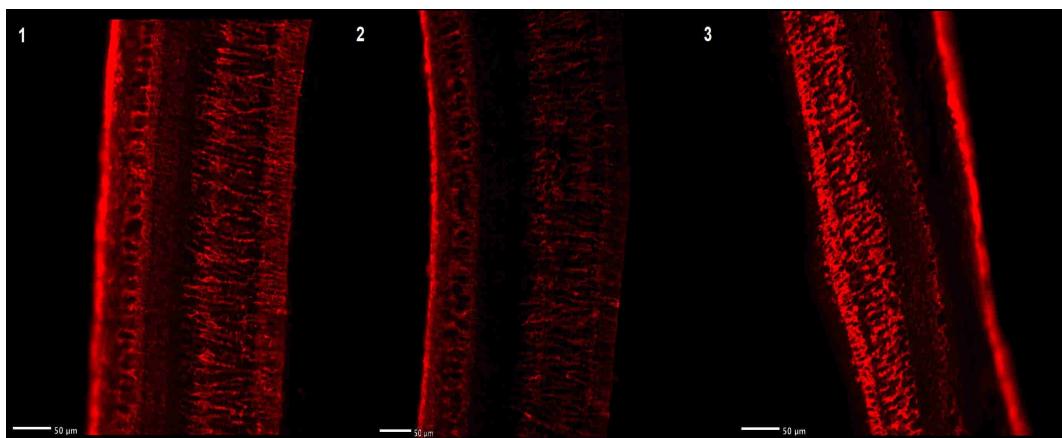


Abbildung 33: Verdünnungsreihe Anti-Glutamin-Synthetase, Sperberretina (*Accipiter nisus*)

Von links nach rechts in aufsteigender Verdünnung: Bild 1) 1:500; Bild 2) 1:800; Bild 3) 1:1000
Rot markiert sind die Müllergliazellen und deren Ausläufer durch die gesamten Retinaschichten in der Verdünnung 1:500 sehr gut nachverfolgbar. In einer Verdünnung von 1:800 lassen sich die Ausläufer weniger gut nachvollziehen, wohingegen eine Verdünnung von 1:1000 die Müllergliazellen gedrungen wirken lässt.

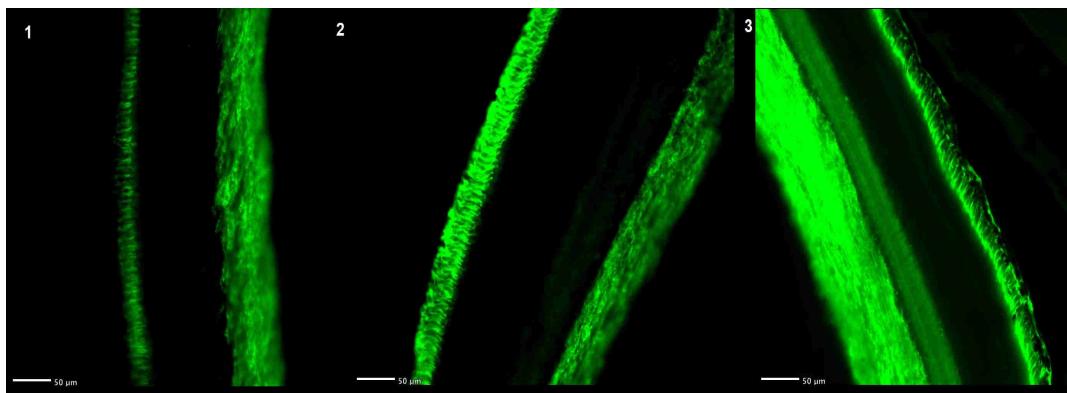


Abbildung 34: Verdünnungsreihe PNA, Sperberretina (*Accipiter nisus*)

Von links nach rechts in aufsteigender Verdünnung: Bild 1) 1:100; Bild 2) 1:200; Bild 3) 1:400

Die grün markierten Zapfen stellen sich am deutlichsten in einer Verdünnung zu 1:200 dar. Eine höhere Verdünnung führt zu einer verstärkten Markierung in den oberen Retinaschichten (NFL und IPL).

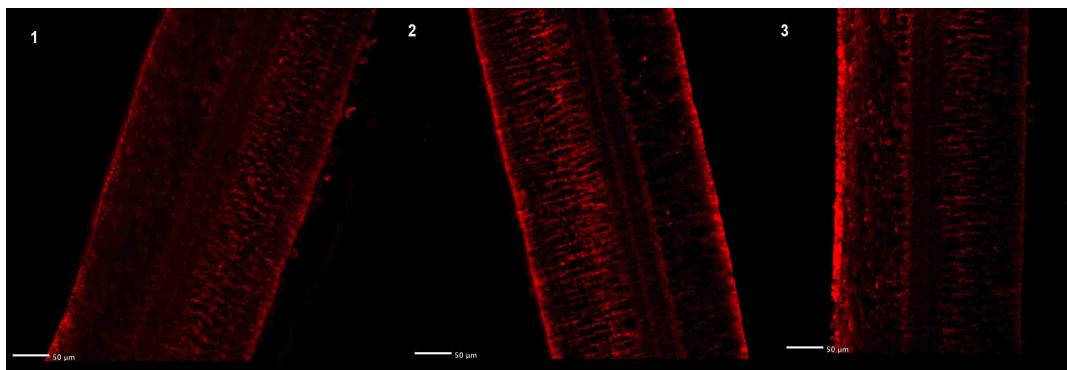


Abbildung 35: Verdünnungsreihe Anti-Glutamin-Synthetase, Waldkauzretina (*Strix aluco*)

Von links nach rechts in aufsteigender Verdünnung: Bild 1) 1:500; Bild 2) 1:800; Bild 3) 1:1000

Eine Verdünnung von 1:800 des primären Antikörpers Anti-Glutamin-Synthetase ermöglicht eine genaue Darstellung der Müllerglia innerhalb der Retinaschichten.

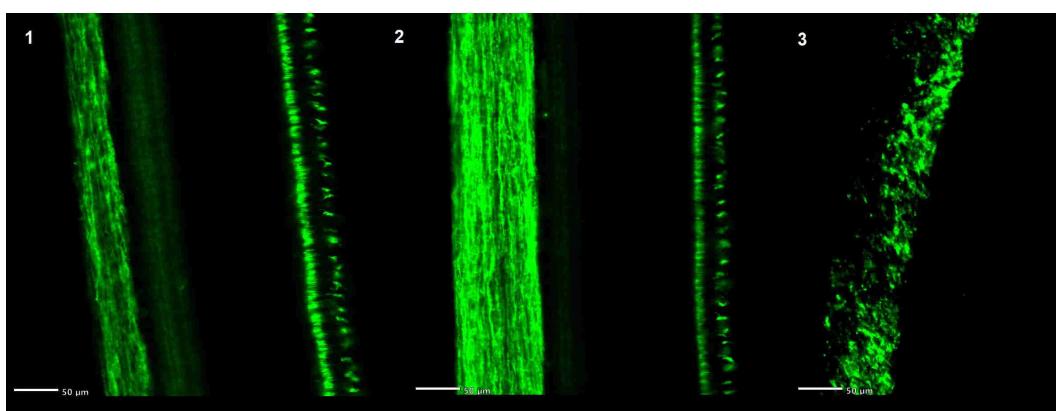


Abbildung 36: Verdünnungsreihe PNA, Waldkauzretina (*Strix aluco*)

Von links nach rechts in aufsteigender Verdünnung: Bild 1) 1:100; Bild 2) 1:200; Bild 3) 1:400

Sowohl Verdünnung 1 als auch 2 führen zu einer starken Markierung des IS und OS der Zapfenschicht. In der Verdünnung 3 sind keine Zapfen sichtbar.

Die Verwendung von Anti-Glutamin-Synthetase führte zu einer sehr guten spezifischen Markierung der Müllergliazellen in einer Verdünnung von 1:600 für alle tagaktiven Greifvögeln. Bei den nachtaktiven Eulenvögeln ergab eine Verdünnung von 1:800 die besten Ergebnisse. Das Lektin PNA zeigte eine starke Bindung an das innere und äußere Segment der Zapfenschicht. Zudem ergab sich in unterschiedlicher Intensität eine Fluoreszenz im Bereich der IPL und eine Bindung an die Axone der Ganglienzellen in der NFL. Teilweise war eine Fluoreszenz innerhalb der OPL detektierbar. Für eine bestmögliche Markierung der Zapfen waren unterschiedliche Verdünnungen für tag- und nachaktive Vertreter nötig. Eine Verdünnung des Lektins von 1:200 für alle tagaktiven Greifvögeln und eine Verdünnung von 1:100 für alle Eulenvögeln führte zu einer sehr guten Darstellung der gewünschten Strukturen.

4.3 Untersuchung mittels OCT

4.3.1 Reproduzierbarkeit

Für die Validierung einer Messmethode ist es notwendig die Genauigkeit, das heißt die Übereinstimmung von voneinander unabhängigen Messwiederholungen zu bestimmen. Die Bestimmung der Reproduzierbarkeit wurde mithilfe der Berechnung eines Variationskoeffizienten (CV) durchgeführt. Hierfür wurde die Software MedCalc Statistical Software Version 18.11.6 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2019) verwendet. Eine Messwiederholung anhand einer zweiten Aufnahme war nicht in jedem Fall möglich, sodass für die Fovea centralis 25 Messungen (entspricht 25 Augen) und für die Fovea temporalis 14 Messungen in die Berechnung des CV eingehen konnten. Für die einzelnen Schichten und die Gesamtdicke waren es insgesamt 51 Messungen.

Für die Fovea centralis ergab die Berechnung einen Variationskoeffizienten von 22,2 %. Für die Fovea temporalis betrug der CV 10,6 %.

Für die Schichtdickenmessungen ergab sich für die Schicht 1 (ILM + NFL + GCL) ein CV von 7,8 %, für Schicht 2 (IPL) 5,6 %, für Schicht 3 (INL + OPL + ONL + ELM) 1,9 % und für Schicht 4 (IS der Zapfenschicht) 10,4 %. Die Gesamtdicke wies einen CV von 1,3 % auf. Damit war die Streuung um den Mittelwert beider Messungen bei den Foveae am größten mit einem CV von über 10 %. Die Schichtdickenmessungen wiesen mit einem CV von deutlich unter 10 % eine geringe Streuung auf, welche sich von Schicht 1 bis 3 abnehmend darstellte. Schicht 4 hingegen zeigte eine deutliche Streuung. Die Gesamtdicke der Retina

ergab den niedrigsten CV-Wert und somit die geringste Streuung. Zur Interpretation dieser Werte wurde sich an den in der Labordiagnostik geltenden Werten orientiert, wobei Untersuchungsmethoden mit einem CV von unter 10 % als sehr präzise eingestuft werden (CUI, 1989). In den Leitlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen werden Werte des CVs von bis zu 30 % toleriert. Zusammenfassend kann somit ausgesagt werden, dass für die Schichtdickenmessungen eine sehr gute bis hervorragende (Schicht 3 und Gesamtdicke) Reproduzierbarkeit vorlag.

4.3.2 Folgeuntersuchungen – Fallbeispiele

Bei drei Waldkäuzen (*Strix aluco*) und einem Mäusebussard (*Buteo buteo*) fanden mehrere Folgeuntersuchungen aufgrund von pathologischen Abweichungen in verschiedenen Abständen statt.

Waldkauz (*Strix aluco*) 1 wurde in einem Fußballnetz verfangen aufgegriffen. Die ophthalmologische Untersuchung mittels indirekter Ophthalmoskopie zeigte am rechten (OD) und linken Auge (OS) eine Alteration der Retina im Bereich der Pectenbasis, die mittels der OCT bestätigt werden konnte. Die Erstuntersuchung am 02.03.2018 zeigte in der Fundusaufsicht einen scharf begrenzten, großen, hellen Bereich um die Pectenbasis (siehe Abbildung 37, S. 59). Es waren zudem diffus verteilt, kleine, dunklere Punkte sichtbar, welche im B-Scan jedoch keine Auffälligkeiten zeigten. Die choroidalen Gefäße waren als dunkelgraue Streifung erkennbar. Der Querschnitt des kraterförmig veränderten Bereichs zeigte Veränderungen in den unteren Retinaschichten auf. Die OPL, ONL, IS/OS und RPE waren wellenartig verzogen. Die Schichten wirkten besonders temporal hyperreflektiv und waren kaum voneinander differenzierbar. Die Zapfenschicht wirkte verbreitert und die obere Begrenzung in nasaler Richtung erschien gezackt. 13 Tage später wurde eine weitere Untersuchung durchgeführt. Die kraterförmige Veränderung wirkte in der Fundusaufsicht organisierter. Im zuvor fast weiß aufgehellten inneren Bereich der Läsion waren wieder fundustypisch, graue Bereiche sichtbar. Die Ränder wirkten dunkler als in der Erstaufnahme. Der B-Scan zeigte in temporaler Richtung eine starke Hyperreflektivität der OPL und der Zapfenschicht. Die Zapfenschicht stellte sich hochgradig gezackt dar und bildete keine einheitlich intakte Schicht mehr. Es war eine Zellenmigration in obere Schichten sichtbar, welche scheinbar von der Photorezeptorenschicht oder dem RPE ausging. Eine Abgrenzung des RPEs war nicht möglich. 28 Tage später fand eine weitere und letzte Untersuchung statt. Der Defekt hatte sich weiter verdunkelt und organisiert. Im B-Scan waren weiterhin Unregelmäßigkeiten in der Zapfenschicht erkennbar, die jedoch deutlich abgenommen hatten. Die obere Grenzlinie der Zapfenschicht war stellenweise nach wie vor nicht intakt und von hyperreflektiven Zellen durchbrochen. Vereinzelt waren migrierte Zellen in weiter oben liegenden Schichten auffällig. Die Folgeuntersuchungen ergaben einen nicht progressiven Prozess. Durch die Begrenzung der Läsion auf den Bereich der Pectenbasis, konnte klinisch keine Visuseinschränkung des Vogels beobachtet werden, sodass der Waldkauz einem Wiederauswilderungsprogram zugeführt werden konnte.

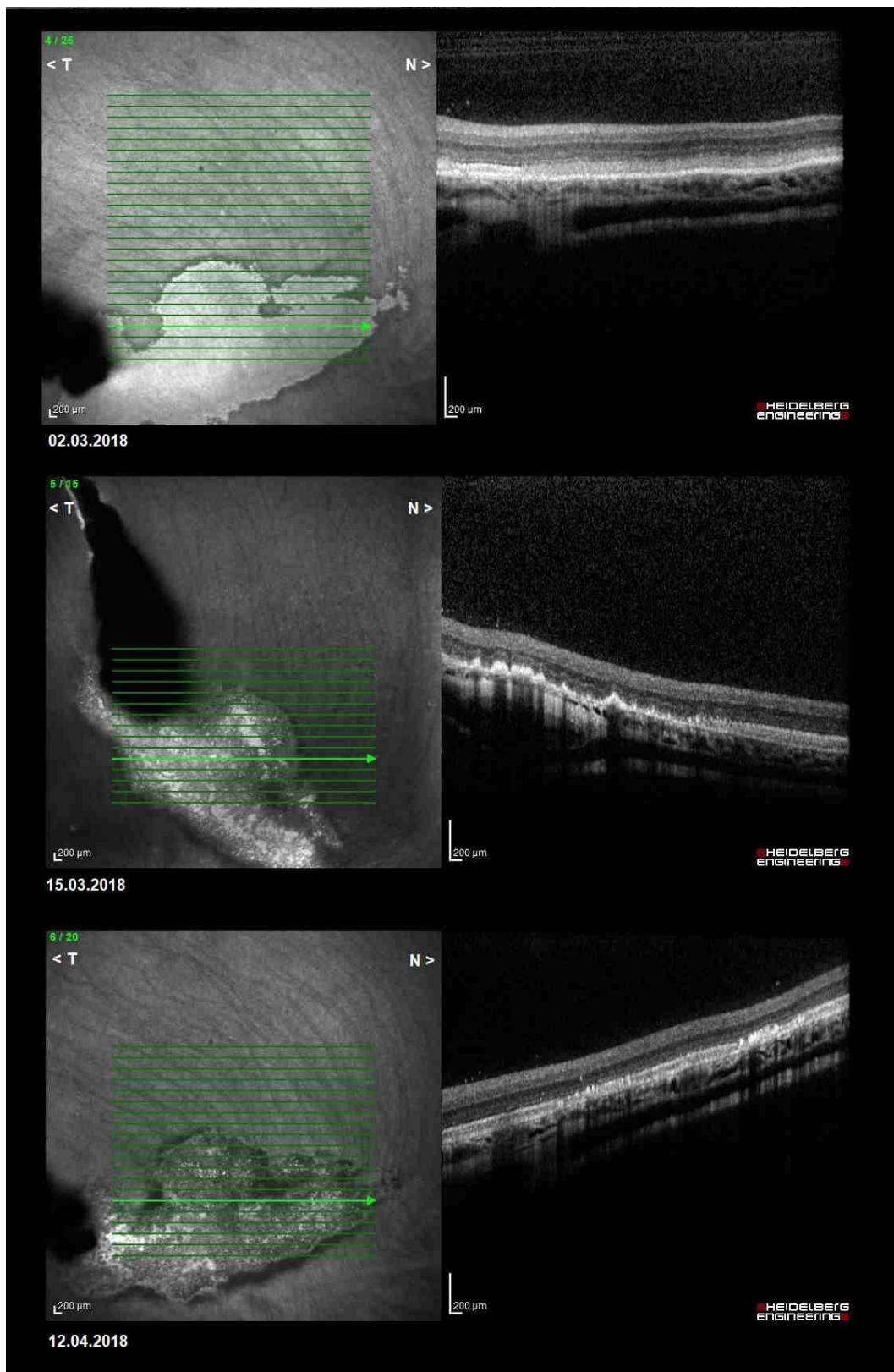


Abbildung 37: Oculus dexter des Waldkauzes (*Strix aluco*) 1

Waldkauz (*Strix aluco*) 2, mit einem unbekannten Vorbericht, zeigte am OD großflächige Veränderungen, welche sich in der Folgeuntersuchung nur geringgradig verändert darstellten (siehe Abbildung 38).

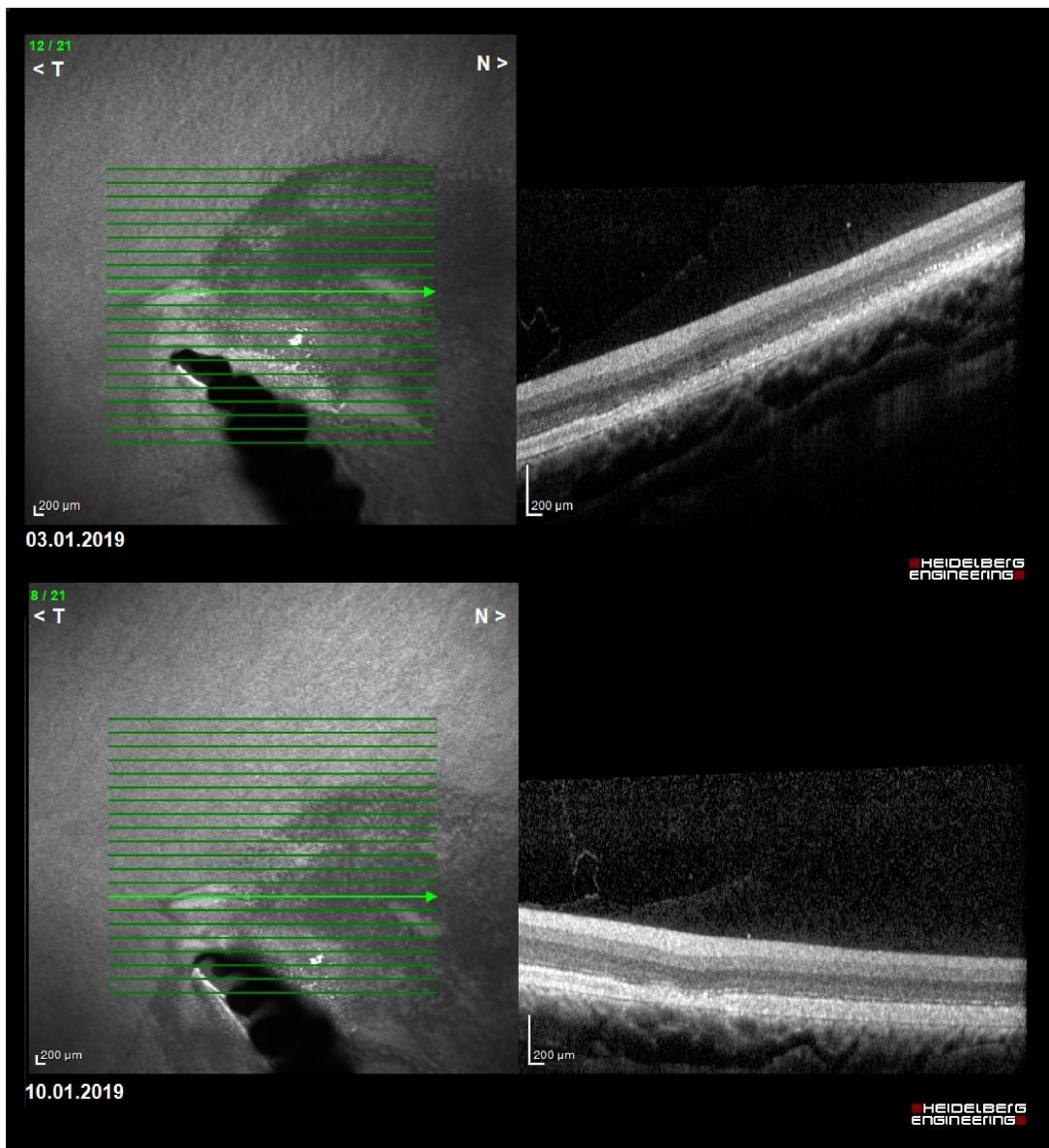


Abbildung 38: Oculus dexter des Waldkauzes (*Strix aluco*) 2

Die Erstuntersuchung zeigte um die Spitze bis zur Hälfte des Pecten oculis eine abweichende Farbgebung des OCT-Bilds in nasaler Richtung. Im Längsschnitt wurde sichtbar, dass hauptsächlich die OPL, die ELM und die Zapfenschicht verändert waren. Es waren hyperreflektive migrierte Zellen in der OPL vorzufinden. Das IS war in diesen Bereichen nicht abgrenzbar und die OPL stellenweise nicht sichtbar. Eine Woche später war die Fundusaufsicht unverändert. In den äußereren Retinaschichten war jedoch ein ruhigeres Bild ersichtlich, die Zahl der migrierten Zellen hatte deutlich abgenommen und die Schichten waren wieder weitestgehend intakt. Die CSI zeigte sich in temporaler Richtung erweitert. Am OS zeigte das OCT-Bild ebenfalls Veränderungen in Form einer großflächigen Aufhellung peripher der Pectenbasis, wie in Abbildung 39 zu sehen ist.

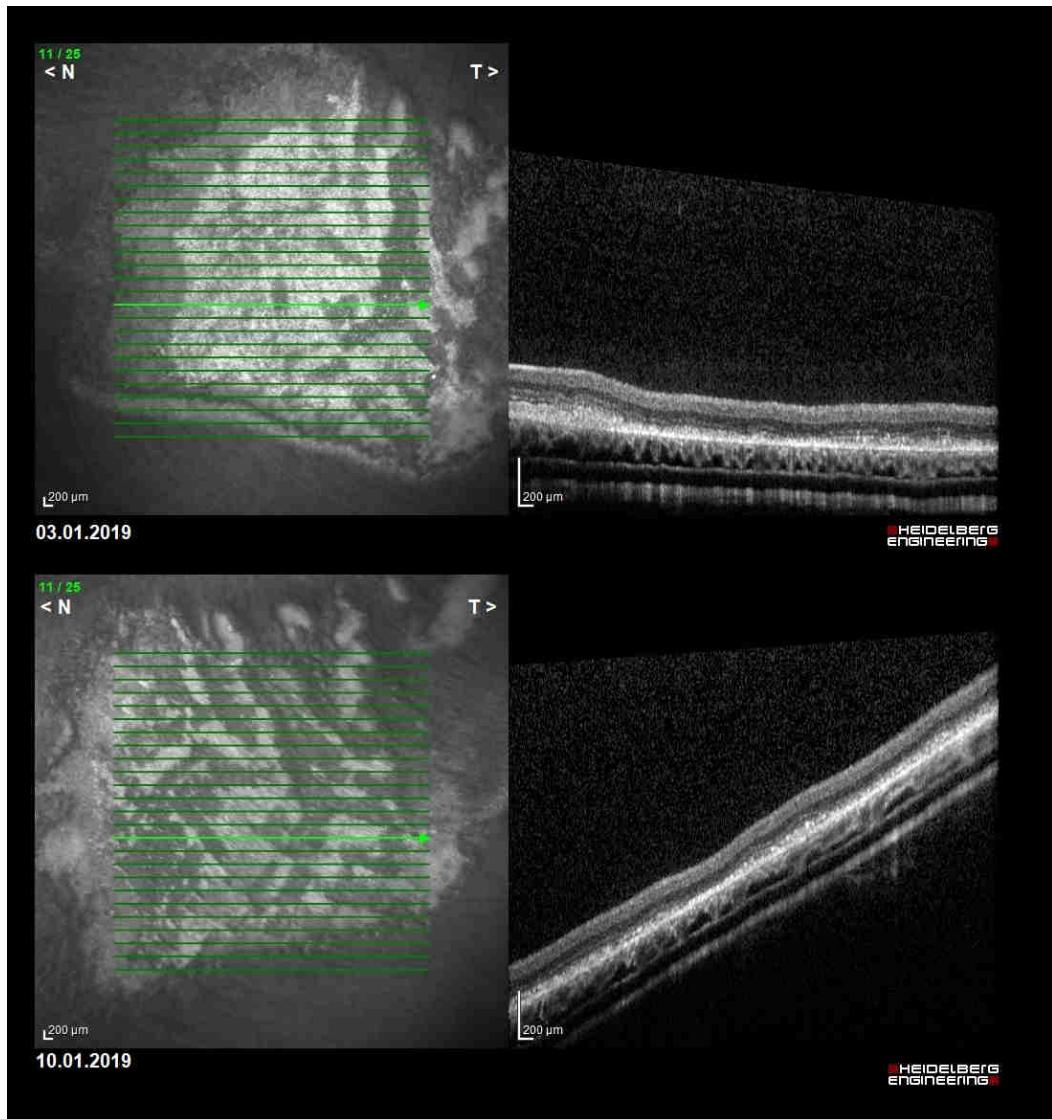


Abbildung 39: Oculus sinister des Waldkauzes (*Strix aluco*) 2

Die Zapfenschicht erschien stellenweise hochgradig wellenförmig verbreitert und führte zu einer Verzerrung der darüberliegenden Schichten. Das Choroid zeigte deutliche Gefäßerweiterungen. In der Folgeuntersuchung erschien die Aufhellung in der Aufsicht nur geringgradig organisierter. Die wellenförmige Verbreiterung der Zapfenschicht hatte abgenommen und im choroidalen Abschnitt erschienen weniger gefüllte Gefäße. Dieser Fall konnte ebenfalls nach einer positiven Visuskontrolle wieder ausgewildert werden.

Ein weiterer Waldkauz (*Strix aluco*) 3 zeigte nach einem Autounfall hochgradige Einblutungen am OD und Läsionen am OS um den Pecten oculi. Nach einer vollständigen Resorption der Einblutung rechts war eine OCT-Untersuchung möglich und eine Läsion nasal auf gesamter Länge des Pecten oculis sichtbar, sowie eine weitere kleinere Alteration rund um die Pectenspitze (siehe Abbildung 40).

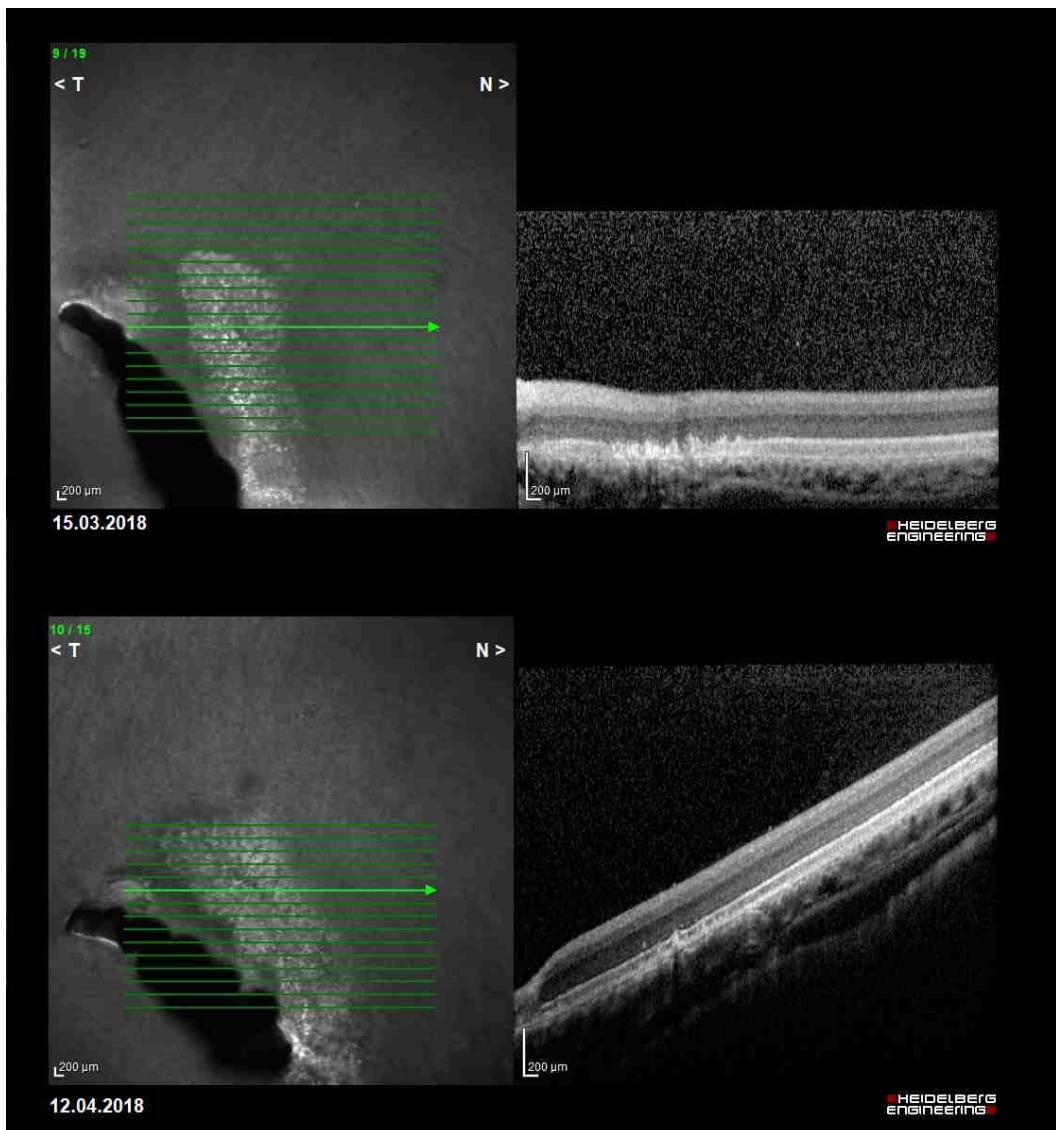


Abbildung 40: Oculus dexter des Waldkauzes (*Strix aluco*) 3

Die Läsion rund um die Spitze des Pecten oculis stellte sich in der Folgeuntersuchung verkleinert dar. Die großflächige Veränderung wirkte nur geringgradig dunkler. Der Längsschnitt zeigte eine deutliche Abnahme der zackenförmigen Veränderung der Zapfenschicht. In der Abbildung 41, S. 63 waren am OS große kraterförmige Alterationen in der Peripherie der Pectenbasis auffällig.

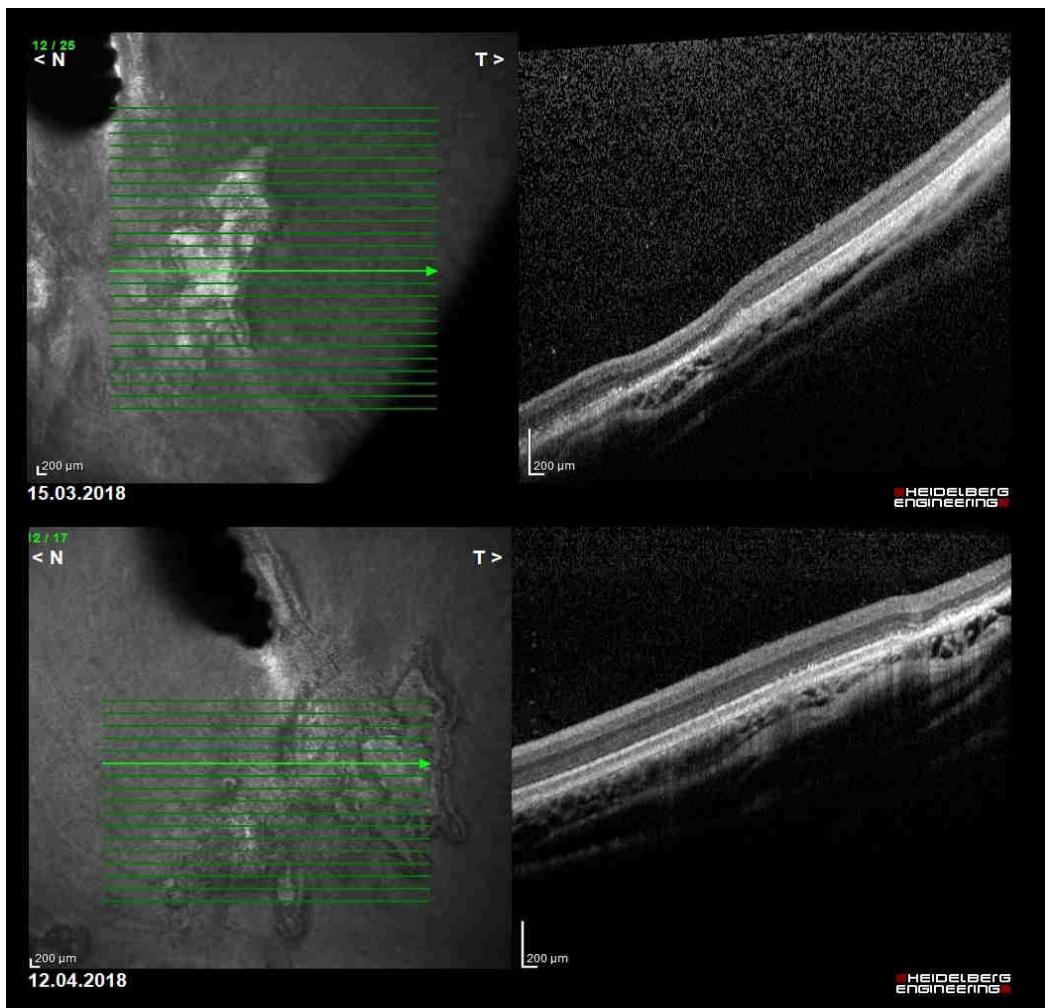


Abbildung 41: Oculus sinsiter des Waldkauzes (*Strix aluco*) 3

In der Folgeuntersuchung schienen diese Veränderungen sich ebenfalls zentral verdunkelt zu haben, im B-Scan war jedoch kein abweichendes Bild feststellbar. Der Visus des Vogels wurde als gut beurteilt und der Waldkauz (*Strix aluco*) der Wiederauswilderung zugeführt.

Bei einem Mäusebussard (*Buteo buteo*), welcher flugunfähig aufgefunden worden ist, zeigte sich in der ophthalmologischen Untersuchung links ein Hyphäma. Eine Beurteilung der hinteren Augenkammer mittels indirekter Ophthalmoskopie war somit initial nicht möglich. Am OD zeigte sich ein Riss und eine Ablösung der Retina, welche mithilfe der OCT bestätigt und im Verlauf verfolgt werden konnte. Der Retinariss war in sämtlichen Aufnahmen sehr gut sichtbar. Aus einer anfänglichen Faltenbildung und einem Aufwurf der Retina an der betroffenen Stelle, war in den nachfolgenden Untersuchungen eine deutliche Degeneration der Retinaschichten zu erkennen, mit einer einhergehenden Reduzierung der Retinadicke und einer Einkerbung in diesem Bereich (siehe Abbildung 42, S. 64).

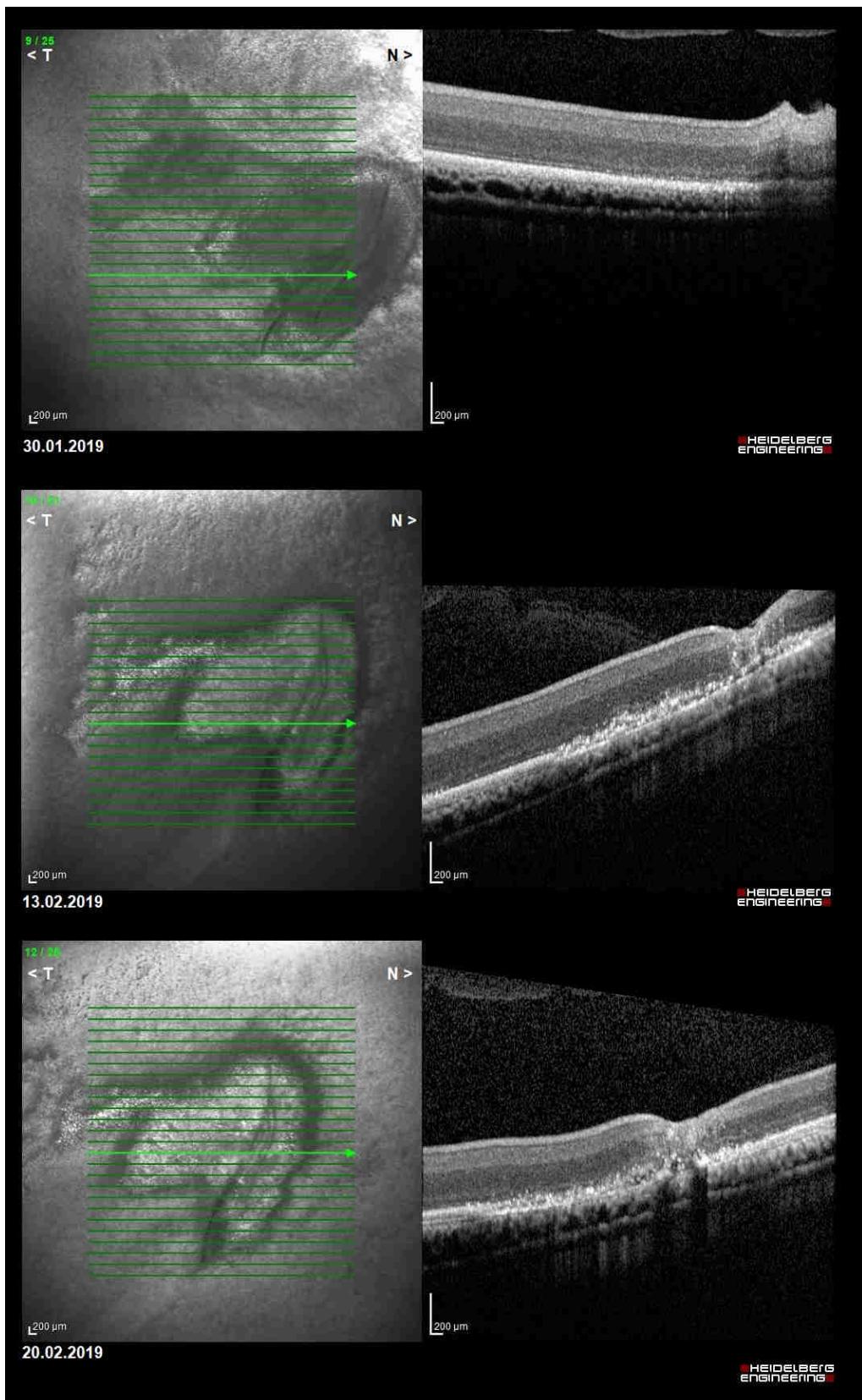


Abbildung 42: Oculus sinsiter des Mäusebussards (*Buteo buteo*)

Während in der ersten Aufnahme der Aufwurf der Retina eine Schatten auf posterior liegende Schichten produzierte, schienen die darunterliegenden

Schichten noch intakt zu sein. In den folgenden Aufnahmen waren degenerative Prozesse sichtbar: Zellen migrierten in obere Schichten, vor allem im Zentrum des Risses. Im Zentrum der Läsion war eine Unterscheidung der einzelnen Schichten nicht mehr möglich. Das RPE und die Zapfenschicht lösten sich auf, OPL und ONL waren nicht mehr differenzierbar und die NFL, IPL und OPL gingen in eine „Narbe“ über (MÜLLER, 2010). Am OS war zwei Wochen später ebenfalls eine Aufnahme mit der OCT möglich (siehe Abbildung 43).

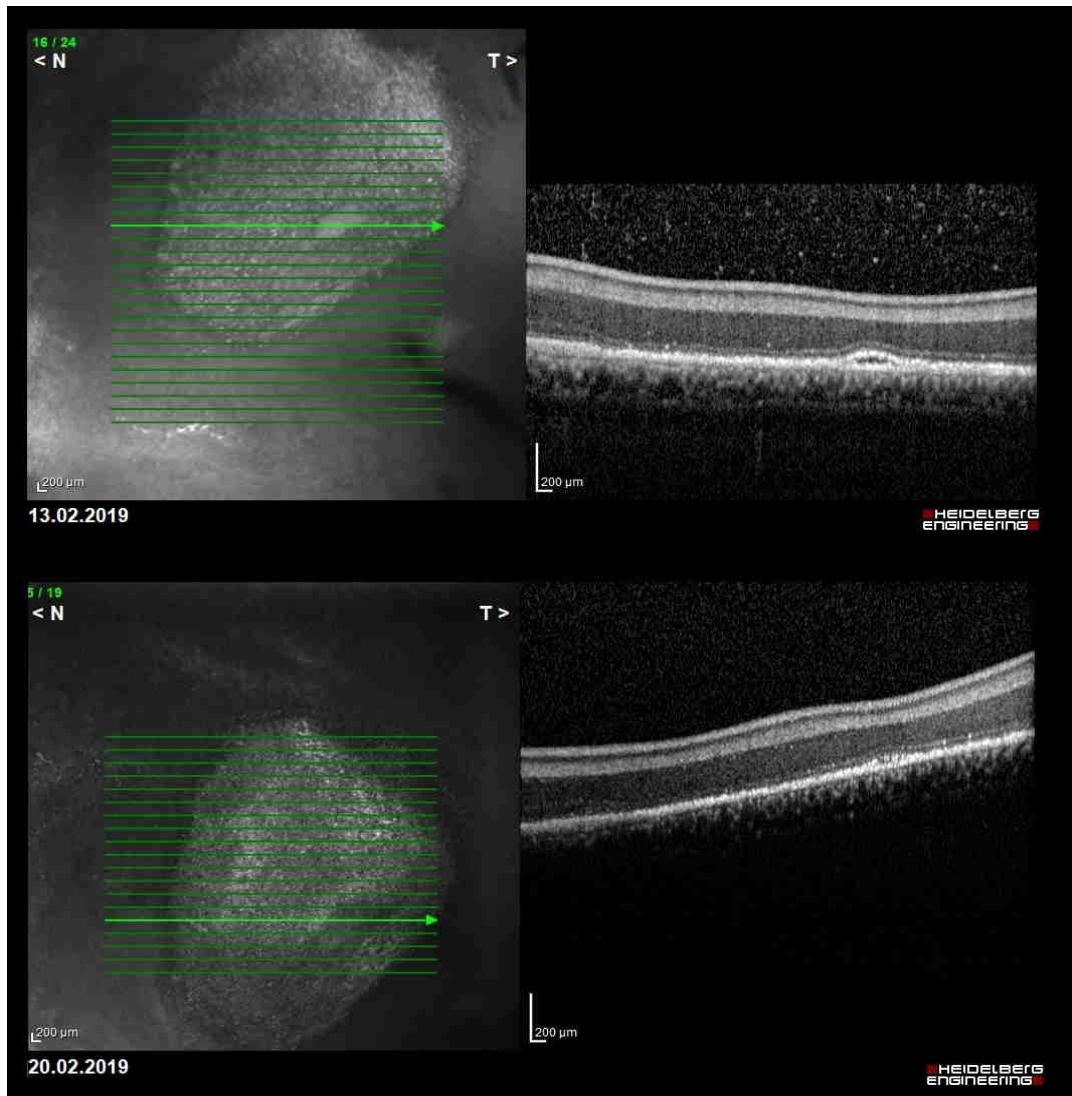


Abbildung 43: Oculus sinister des Mäusebussards (*Buteo buteo*)

In der Pectenperipherie war ein großflächiger Defekt sichtbar, welcher im Längsschnitt eine Ablösung der Zapfenschicht vom RPE darstellte und hyperreflektive Punkte im Bereich des Glaskörpers. In der zweiten Aufnahme war sichtbar, dass sich die Zapfenschicht weitestgehend wieder angelegt hatte. Der Visus des Tieres stellte sich als nicht ausreichend dar, sodass sich in diesem Fall die Euthanasie anschloss.

4.3.3 Weitere pathologische Befunde

Häufig anzutreffen und vor allem bei den Eulenvögeln in dieser Studie zu beobachten, waren punktuelle, blasenartige Veränderungen in unterschiedlicher Ausprägung und Anzahl, die in Vorgängerstudien als Drusen bezeichnet werden (RAUSCHER et al., 2013; AZMANIS et al., 2015). Solche Veränderungen sind in Abbildung 44, Abbildung 45, Abbildung 46, Abbildung 47 und Abbildung 48 zu sehen. In der Abbildung 44 war im Längsschnitt lediglich eine geringgradige wellenförmige Verzerrung der tiefen Retinaschichten zu finden. Die ELM war stellenweise hyperreflektiv und im Choroid waren deutlich gefüllte Gefäße erkennbar.

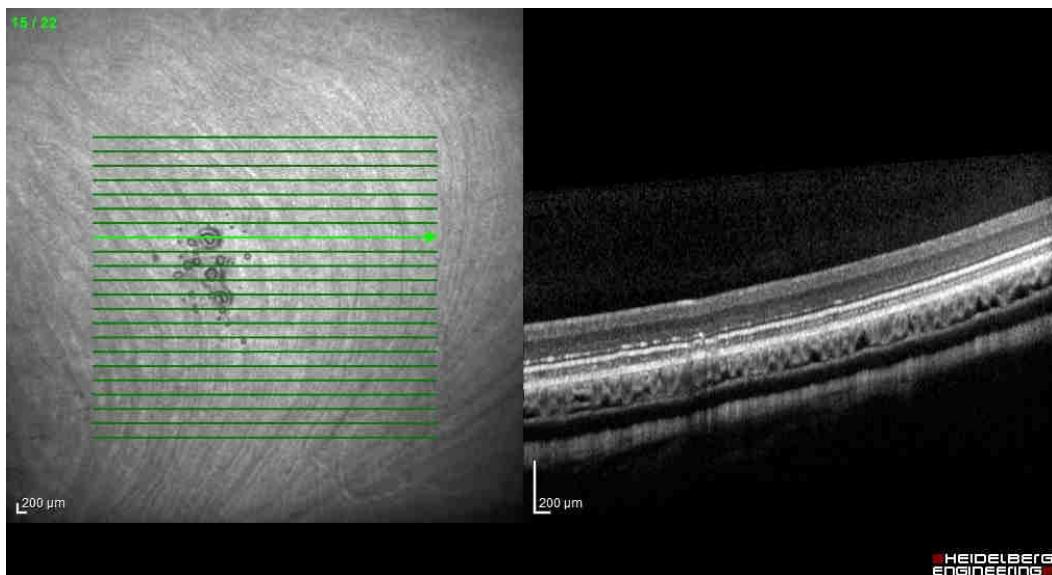


Abbildung 44: Oculus dexter eines Waldkauzes (*Strix aluco*)

Drusenartige Veränderungen mit Verzerrungen und hyperreflektiven Bereichen im Bereich der ELM und Zapfenschicht

Die Abbildung 45, Seite 67 zeigt weniger stark ausgeprägte Veränderungen in der Fundusaufsicht. Hier waren ebenfalls hyperreflektive Bereiche in der ELM erkennbar und rundliche Defekte, welche durch das RPE und die Zapfenschicht zogen. Das Choroid schien unauffällig.

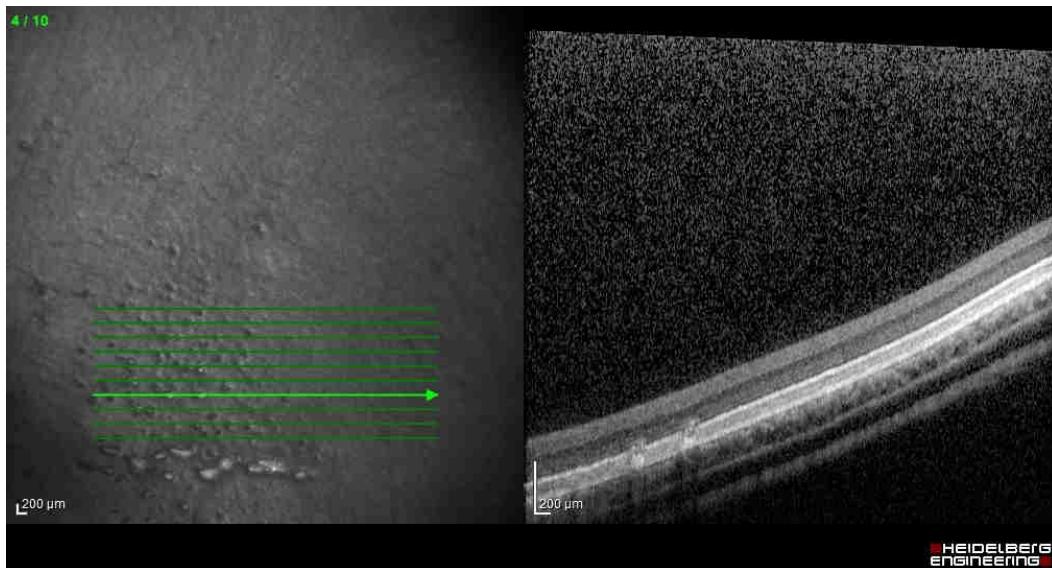


Abbildung 45: Oculus dexter eines Waldkauzes (*Strix aluco*)

Multiple fokale Alterationen sichtbar, im B-Scan Veränderungen innerhalb des RPEs bis zur ELM auffällig

Eine wellenförmige Verzerrung der Zapfenschicht und der ELM, wie sie in Abbildung 44 auftrat, ist in Abbildung 46 ebenfalls sichtbar, sowie eine Erweiterung des Choroids.

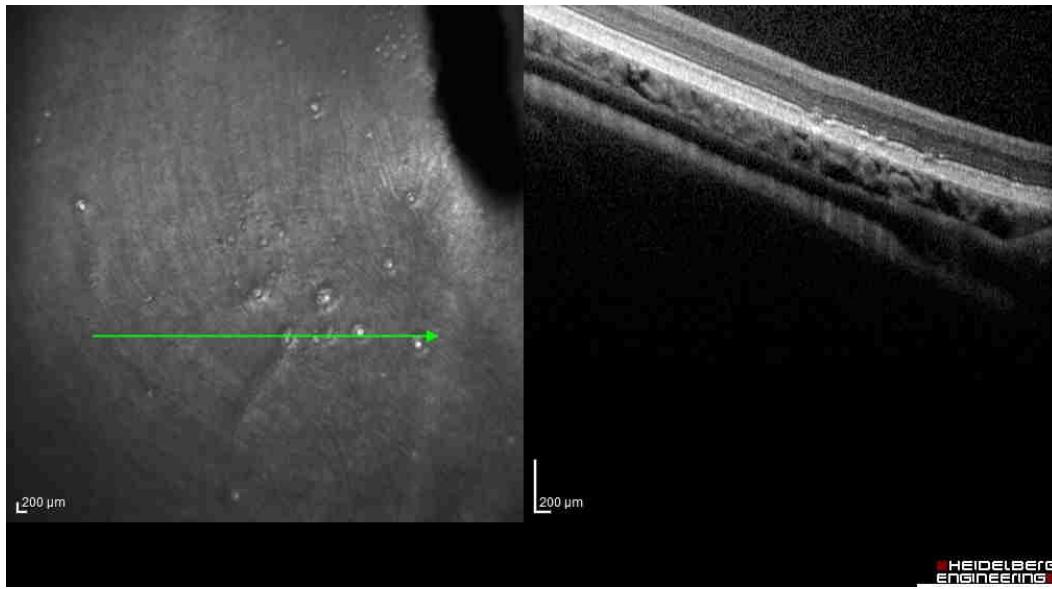


Abbildung 46: Oculus sinister eines Waldkauzes (*Strix aluco*)

Drusenartige Veränderungen mit wellenförmiger Verzerrung der Zapfenschicht und der ELM

Abbildung 47, Seite 68 zeigt eine andere Form der blasenartigen Veränderung im Längsschnitt. Das Choroid war erweitert und es war eine zystoide Veränderung mit einem Hohlraum im Bereich der Zapfenschicht zu sehen, an dessen Stelle die ELM verdickt und hyperreflektiv erschien.

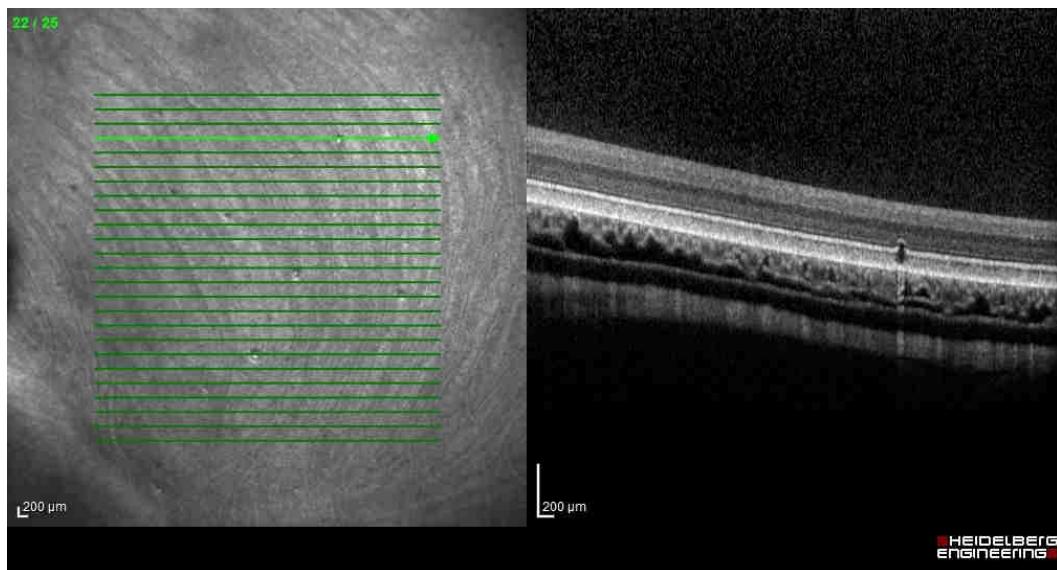


Abbildung 47: Oculus dexter eines Waldkauzes (*Strix aluco*)

Weitere drusenartige Alteration mit zystoider Veränderung innerhalb des RPEs bis zur ELM

Bei einer Waldohreule (*Asio otus*) ließen sich sehr ähnliche Veränderungen finden. Der B-Scan zeigte lediglich eine Hyperreflektivität der ELM (siehe Abbildung 48).

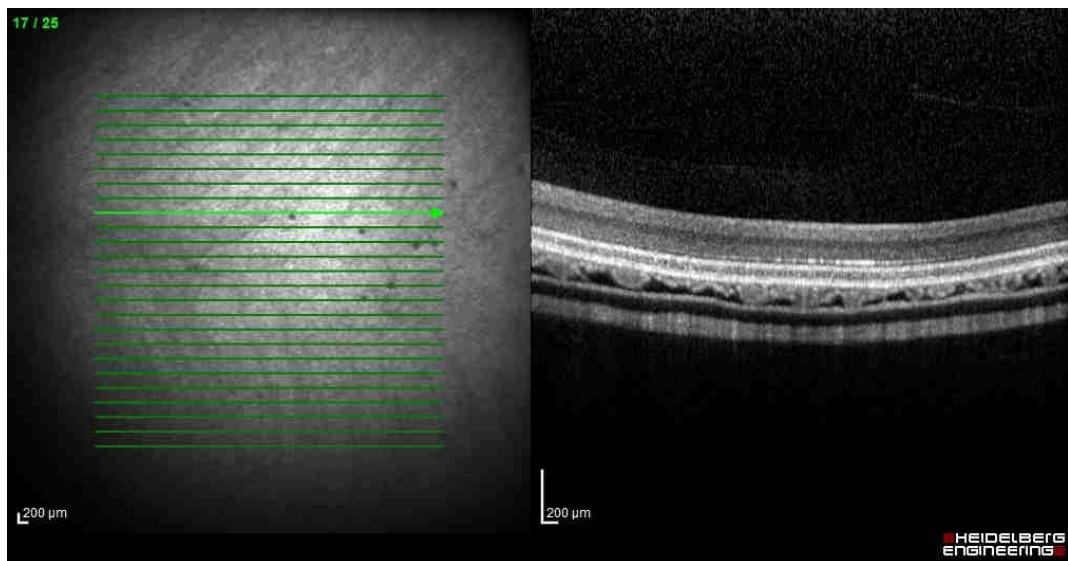


Abbildung 48: Oculus sinister einer Waldohreule (*Asio otus*)

Punktuelle Veränderungen in der Fundusaufsicht, im B-Scan Hyperreflektivität der ELM auffällig

In der Abbildung 49, Seite 69 ist eine hochgradige Netzhautablösung sichtbar mit einer subretinalen Flüssigkeitsansammlung, die zu einem Schattenwurf auf weiter posterior liegende Schichten führt.

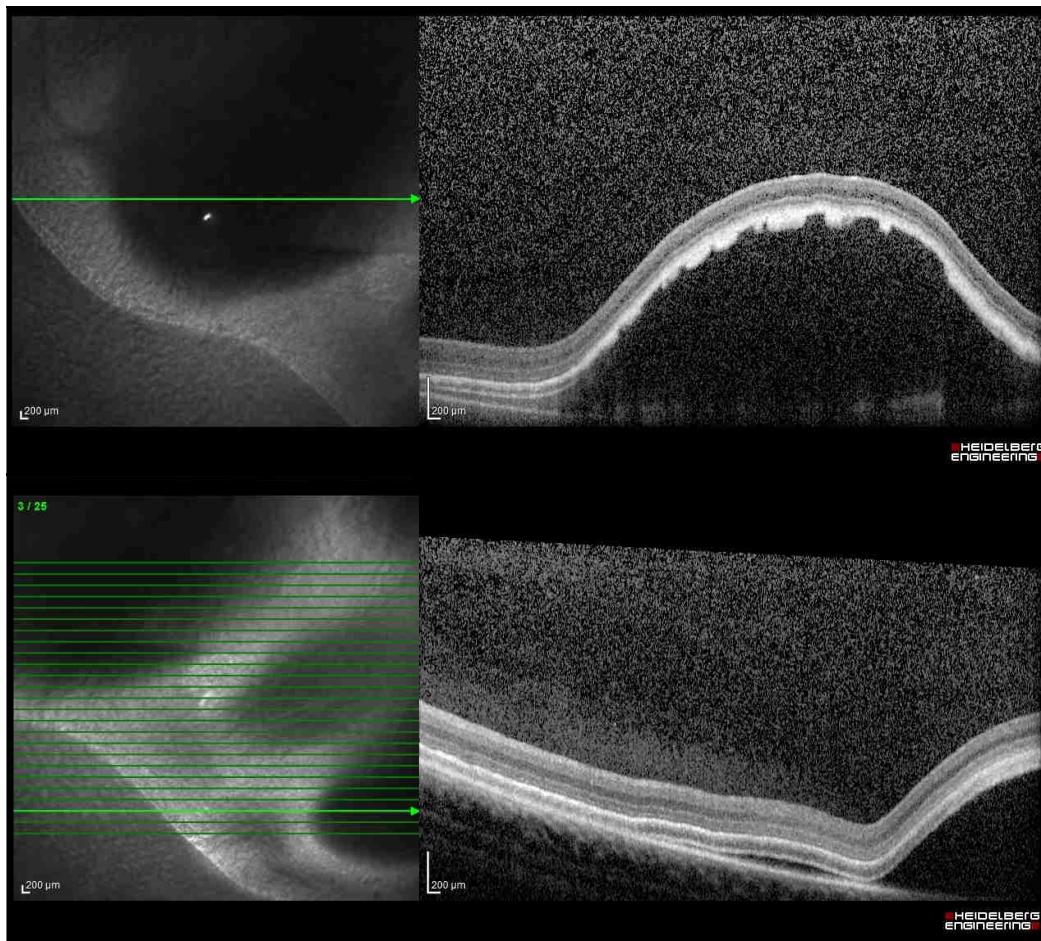


Abbildung 49: Oculus dexter Waldkauz (*Strix aluco*)

Hochgradige Netzhautablösung mit Flüssigkeitsansammlung im subretinalen Raum

4.4 OCT vs. CLSM

4.4.1 Darstellung der physiologischen Retinaschichten

Innerhalb der OCT-Aufnahme war eine Differenzierung der meisten anatomischen Retinaschichten möglich. Die ILM kann grundsätzlich nicht separat von der NFL beobachtet werden (siehe unter 2.2.4 Interpretation von aviären retinalen Tomogrammen). Hin und wieder waren in der vorliegenden Studie jedoch hellere Bereiche an der oberen Grenze der NFL sichtbar, welche Hinweise auf die ILM geben könnten. Das Verhalten der Retinaschichten peripher und zentral der Fovea wurde bereits in den Studien von SCHULZE (2016) und VELASCO GALLEGOS (2015) beschrieben. Die folgenden Beobachtungen der aktuellen Studie decken sich somit mit den vorangegangenen Untersuchungen. So reduziert sich die NFL vollständig bis zum tiefsten Punkt der Fovea centralis. Auffällig war jedoch, dass die NFL in temporaler Richtung der Fovea dicker erschien als nasal. Die kernhaltige GCL

war als dunklere Ebene darunter in der Nähe der Fovea centralis ebenfalls gut erkennbar, da sie in Richtung der Area foveae an Breite zunahm. In der Peripherie konnte sie nicht immer separat beobachtet werden. Zum Zentrum der Fovea centralis wurde die GCL schmäler und schien oftmals vollständig zu verschwinden. Die untere und obere Grenze der sehr breiten und hellen IPL konnten in jeder Aufnahme sehr gut differenziert werden. Die IPL reduzierte sich ebenfalls vollständig bis zum tiefsten Punkt der Fovea centralis. Die INL stellte sich zuverlässig als dunkle Schicht angrenzend dar und nahm erst an Dicke zu bevor sie sich zur Fovea centralis hin reduzierte. Die OPL konnte meist als hellere Linie erahnt werden und war auch im Zentrum der Fovea lokalisierbar. Die darunterliegende weniger stark streuende ONL war ebenso auffindbar und nahm an Dicke zur Fovea hin zu. Die Grenzen der OPL und ONL konnten jedoch nicht immer genau definiert werden. Die ELM stellte sich als durchgehende feine, helle Linie dar und war bis auf wenige Ausnahmen sehr gut sichtbar. Das IS der Zapfenschicht war in den meisten Fällen als stärker streuende Schicht vom OS abgrenzbar. Das OS war meist nicht vom RPE differenzierbar (siehe Abbildung 50). Im Bereich der Fovea temporalis verhielten sich die Schichten meist analog zur Fovea centralis. Im Unterschied zu den genannten Vorgängerstudien war bei den Eulen eine Unterscheidung ab der OPL generell nicht mehr möglich.

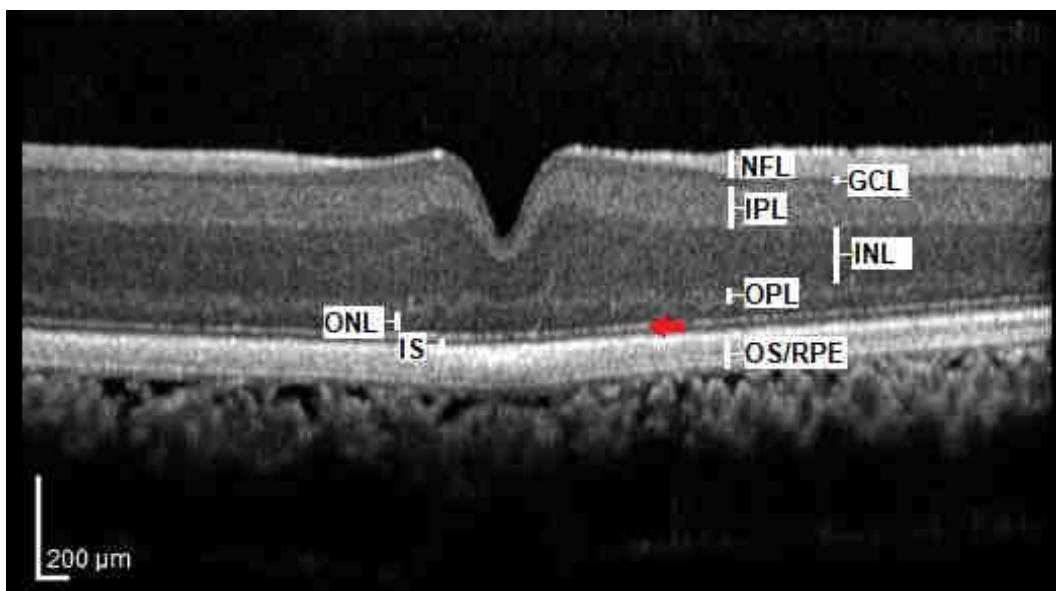


Abbildung 50: OCT-Darstellung der Retinaschichten

NFL - Nerve Fiber Layer, GCL - Ganglion Cell Layer, IPL - Inner Plexiform Layer, INL - Inner Nuclear Layer, OPL - Outer Plexiform Layer, ONL - Outer Nuclear Layer, ELM - External Limiting Membrane, IS - Inner Segment, OS - Outer Segment; ELM wird durch den Pfeil angezeigt

In der CLSM-Aufnahme waren sämtliche Grenzen der Retinaschichten genau definierbar und der OCT somit überlegen (siehe Abbildung 51 und Abbildung 52).

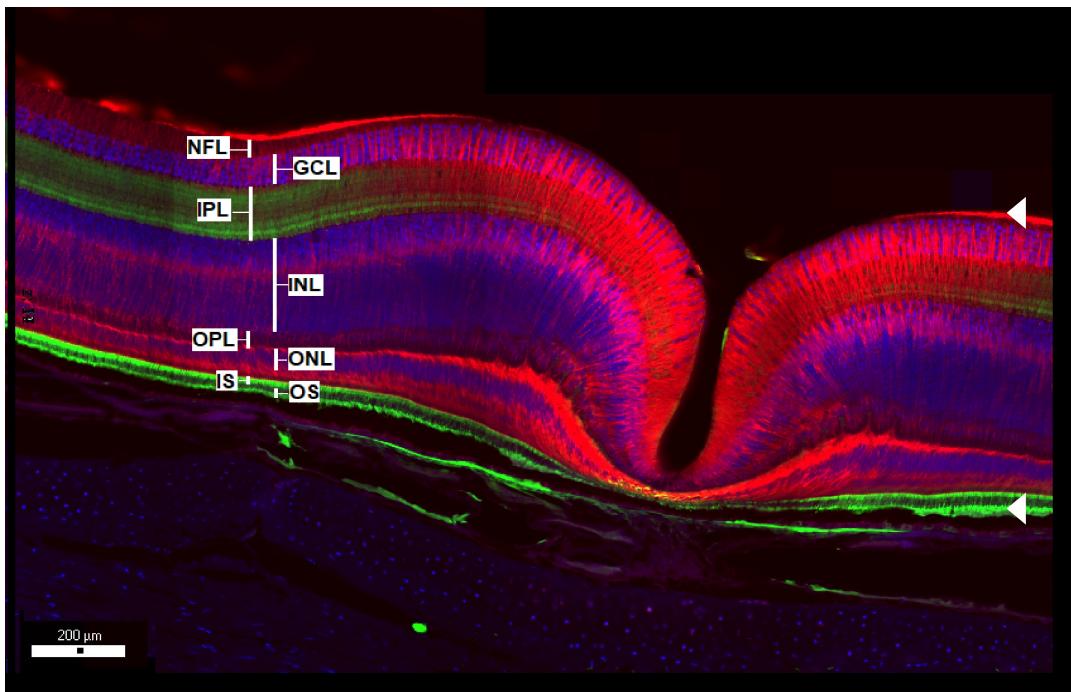


Abbildung 51: CLSM – Retinaschichten im Bereich der Fovea

NFL - Nerve Fiber Layer, GCL - Ganglion Cell Layer, IPL - Inner Plexiform Layer, INL - Inner Nuclear Layer, OPL - Outer Plexiform Layer, ONL - Outer Nuclear Layer, IS - Inner Segment, OS - Outer Segment, oberer Pfeil - ILM (Internal Limiting Membrane), unterer Pfeil - ELM (External Limiting Membrane)

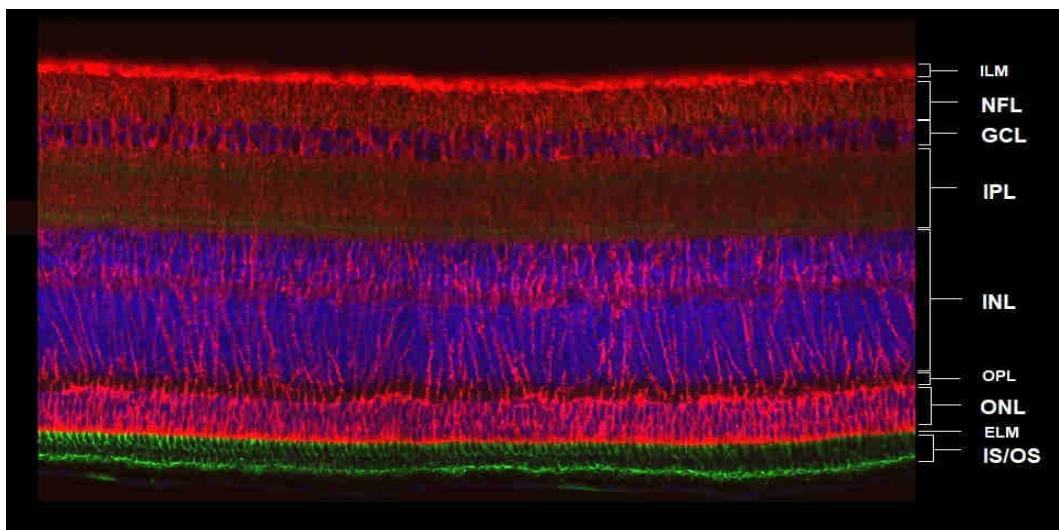


Abbildung 52: CLSM – Retinaschichten in der Peripherie

ILM - Internal Limiting Membrane, NFL - Nerve Fiber Layer, GCL - Ganglion Cell Layer, IPL - Inner Plexiform Layer, INL - Inner Nuclear Layer, OPL - Outer Plexiform Layer, ONL - Outer Nuclear Layer, ELM - External Limiting Membrane, IS - Inner Segment, OS - Outer Segment

Die Fortsätze der Müllergliazellen waren über sämtliche Schichten hinweg nachverfolgbar und die NFL deutlich erkennbar. Ebenso waren die stark rot fluoreszierende ILM und ELM differenzierbar. Die ILM und die NFL waren analog zum B-Scan des OCTs innerhalb der Fovea centralis nicht mehr vorhanden. Die Kernschichten (GCL, INL, ONL) waren durch die Kernfärbung deutlich blau fluoreszierend abgrenzbar, dabei stellte sich die GCL weniger stark fluoreszierend dar. Alle kernhaltigen Schichten nahmen in Richtung der Area fovea centralis an Dicke zu und verdünnten sich abrupt zum tiefsten Punkt der Fovea centralis, dabei war in der CLSM ebenfalls eine vollständige Reduzierung der GCL zu erkennen. Insgesamt war eine sehr hohe Anzahl an Zellkernen auffällig, die zu einer unscharfen und dicht gepackten Erscheinung führten. Die Differenzierung einzelner Zellkerne war aus diesem Grund nicht möglich. Grün fluoreszierend ließ sich das IS vom OS der Zapfenschicht durch eine abweichende Morphologie unterscheiden. Das Ende des OS war meist nicht definierbar, da das RPE nicht fluoreszenzmarkiert wurde und das OS sich oftmals vom RPE gelöst darstellte. Im tiefsten Punkt der Fovea verschwanden die ILM, die NFL und die IPL. Erhalten blieben die INL, ONL, OPL, ELM und die Zapfenschicht. Die Zapfenschicht erschien im Zentrum der Fovea centralis stark reduziert. Im Bereich der temporalen Fovea reduzierte sich die NFL bereits weit vor der Area temporalis (siehe Abbildung 53). Teilweise war die GCL im Bereich der Fovea temporalis noch sichtbar, abhängig davon wie tief diese im Anschnitt getroffen worden war. Die weitere Schichtung verhielt sich analog zur Fovea centralis.

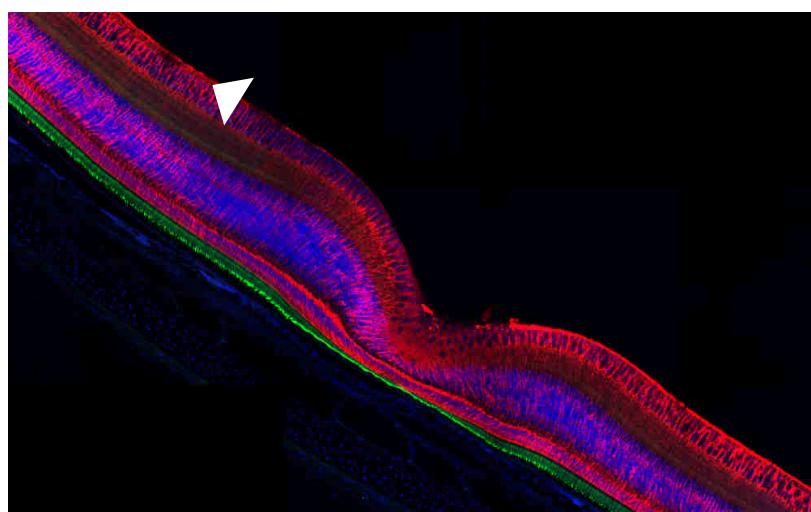


Abbildung 53: Retinale Schichtung im Bereich der Fovea temporalis

Sämtliche Schichten verhalten sich analog zum Bereich der Fovea centralis. Der Pfeil markiert die bereits früh endende NFL.

Bei einer physiologischen Retina einer Waldohreule (*Asio otus*) wichen die Darstellung in der CLSM von den tagaktiven Greifvögeln ab und stimmte mit den bekannten anatomischen Unterschieden überein. Die Retina wirkte deutlich dünner. In der GCL waren weniger Zellkerne vorzufinden und die Schicht insgesamt sehr viel dünner als im Vergleich zu einem Turmfalken (*Falco tinnunculus*). Die INL war deutlich reduziert und eine weniger flächige Färbung erkennbar, aufgrund einer geringeren Zellkernzahl. Dafür war die ONL breiter als bei den tagaktiven Vertretern und eine sehr starke und flächige Anfärbung sichtbar (siehe Abbildung 54).

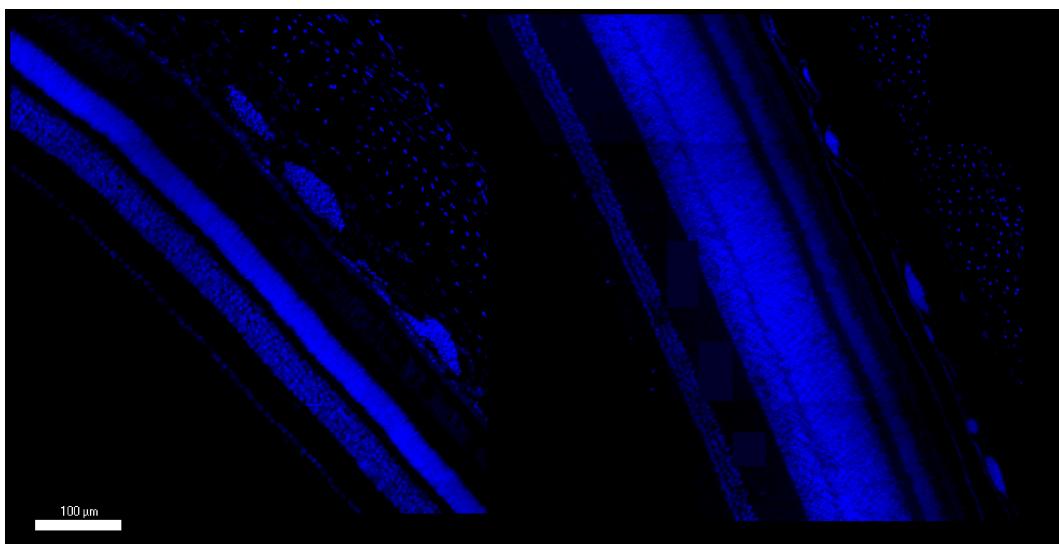


Abbildung 54: Zellkernschichten im Vergleich nacht- und tagaktiver Vogel

Links: Waldohreule (*Asio otus*); Rechts: Turmfalke (*Falco tinnunculus*)

Die Müllerglia wirkten bei dem nachaktiven Vogel gedrungener mit kürzeren Ausläufern. Die ILM und ELM stellten sich breiter dar (siehe Abbildung 55).

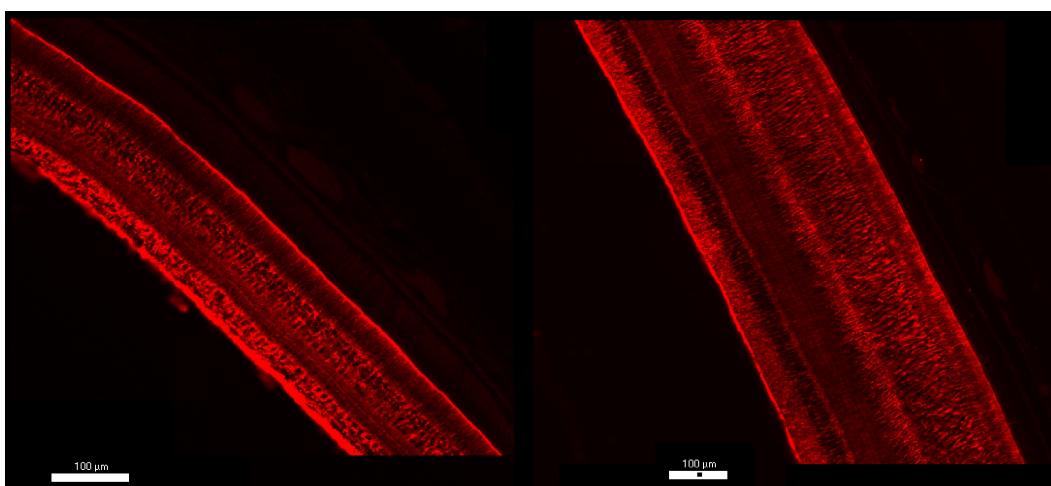


Abbildung 55: Müllergliazellen im Vergleich tag- und nachaktiver Vogel

Links: Waldohreule (*Asio otus*); Rechts: Turmfalke (*Falco tinnunculus*)

Die Markierung mit PNA führte zu einer starken Bindung an die Axone der NFL und der IPL. Es war zudem eine sehr deutliche Bindung im Bereich der OPL zu sehen. Die Zapfen waren, wie zu erwarten, in einer geringeren Anzahl vorzufinden und stellten sich morphologisch etwas anders dar als bei dem Turmfalken (*Falco tinnunculus*) (siehe Abbildung 56).

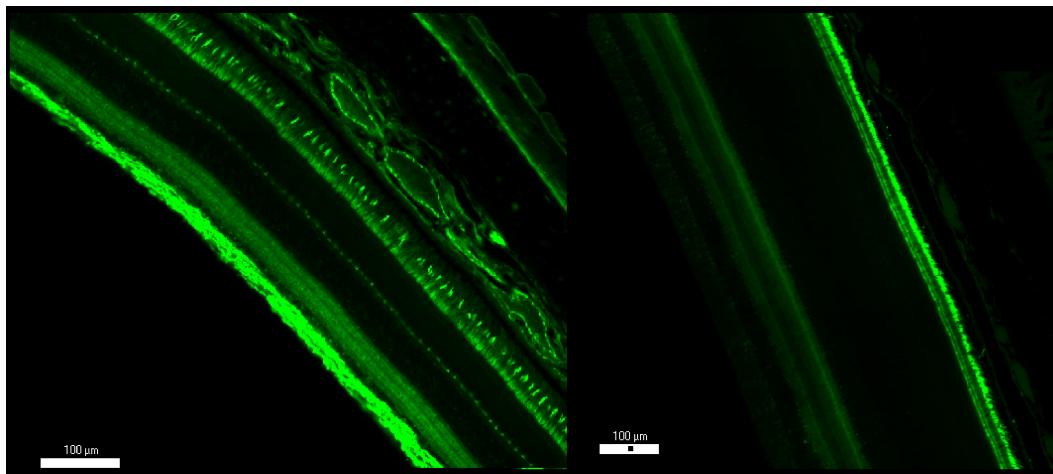


Abbildung 56: PNA Markierung im Vergleich tag- und nachaktiv

Links: Waldohreule (*Asio otus*); Rechts: Turmfalke (*Falco tinnunculus*)

4.4.2 Artefakte

Bei der OCT-Aufnahme trat bei kleineren Augen wie bei Turmfalken (*Falco tinnunculus*) und Sperbern (*Accipiter nisus*) eine Vignettierung, das heißt eine Schwarzfärbung des Randes in der Fundusaufsicht auf (VELASCO GALLEGOS, 2015; SCHULZE, 2016). Im Längsschnitt äußerte sich das Artefakt jedoch nicht und hatte somit keinen Einfluss auf Messungen (siehe Abbildung 57). Weitere nennenswerte Artefakte traten bei dem *in vivo* Verfahren nicht auf.

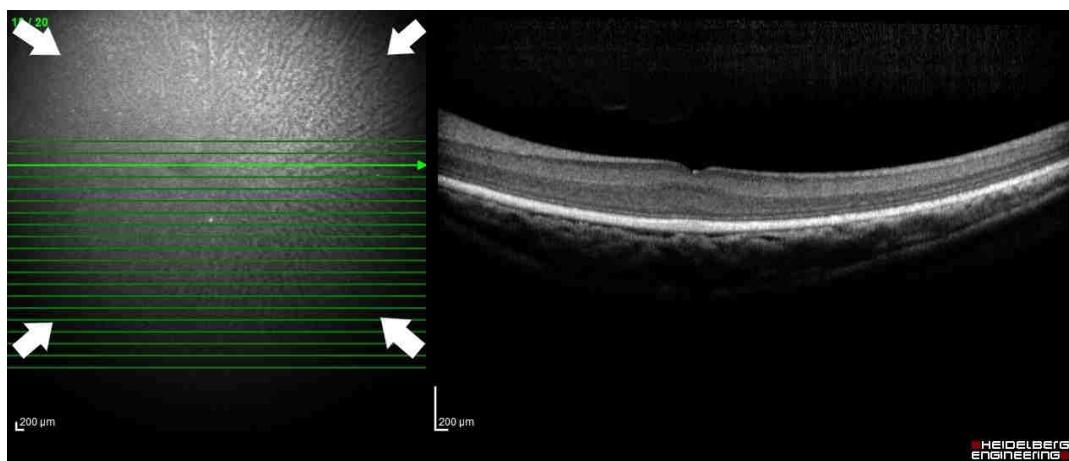


Abbildung 57: Vignettierung im OCT-Bild

Bei der ex vivo Konfokalmikroskopie, verursachte die histologische Verarbeitung der Proben eine Reihe von Artefakten. Dabei kam es häufig zu Zerreißungen innerhalb der Retinaschichten, wie in Abbildung 58 zu sehen.

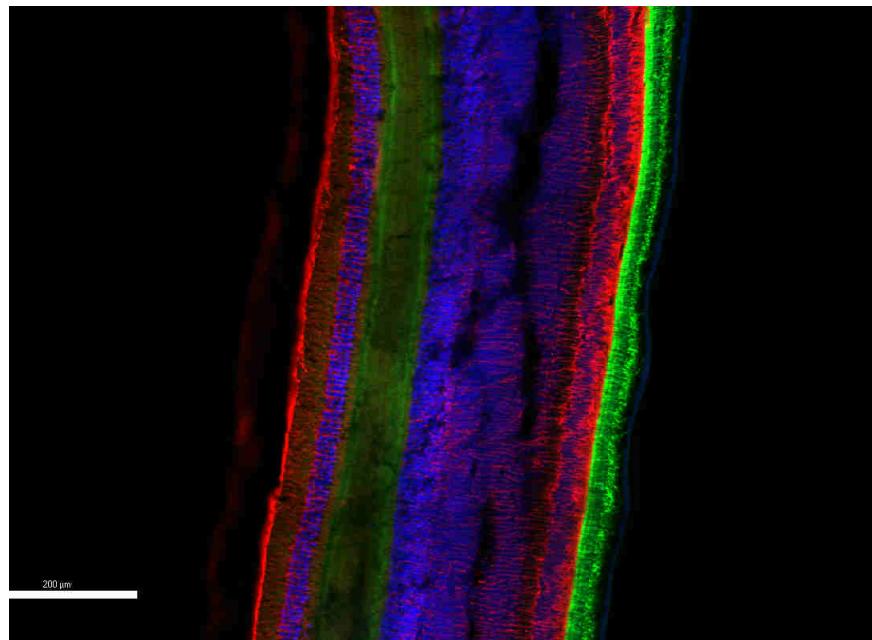


Abbildung 58: Risse innerhalb Retinaschichten in der CLSM-Aufnahme

Ein Aufwurf mit einer Faltenbildung der Retina, sowie eine Lösung vom Objektträger und ein Umschlagen des Schnittes waren ebenso häufige Artefakte (siehe Abbildung 59 und Abbildung 60, S. 75-76).

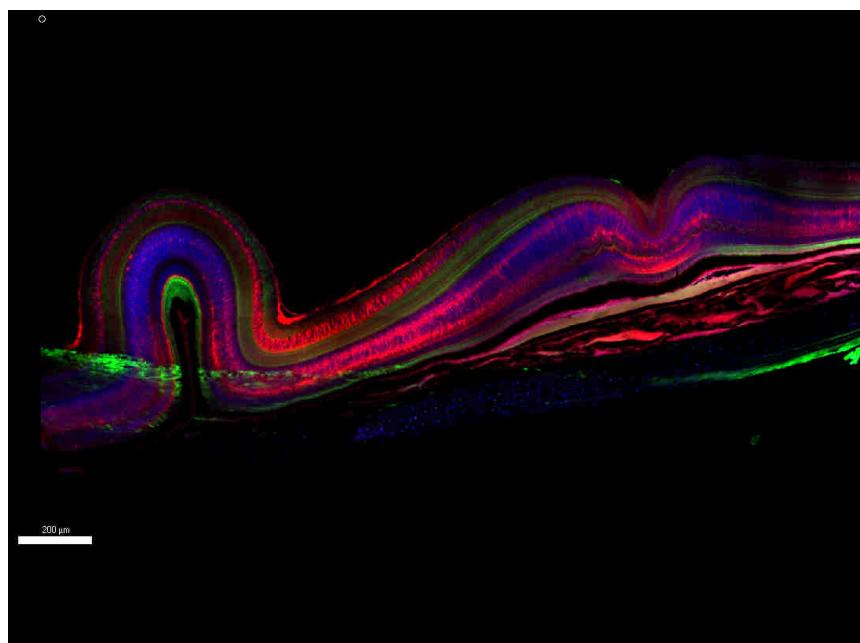


Abbildung 59: Faltenbildung innerhalb der CLSM-Aufnahme

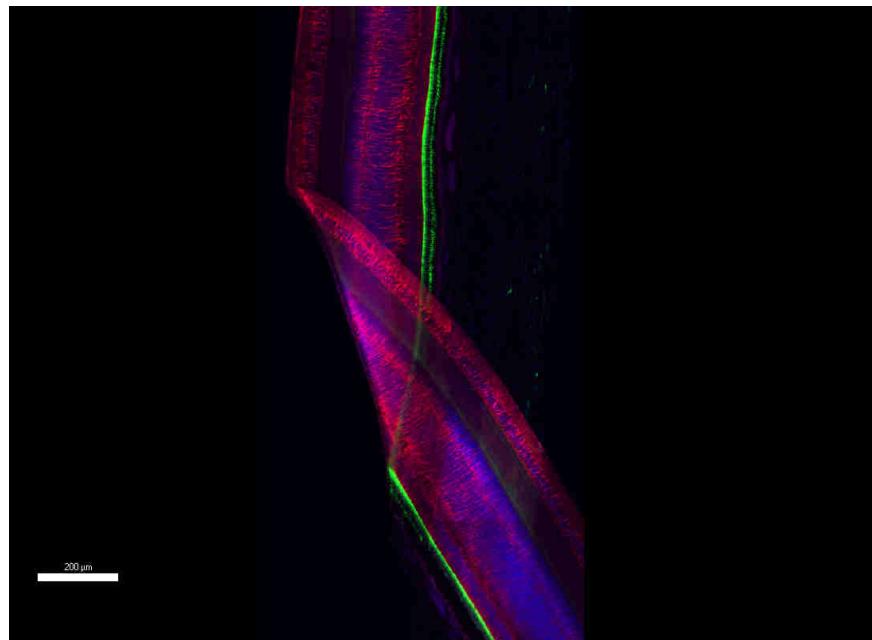


Abbildung 60: Umschlagen des Schnittes innerhalb der CLSM-Aufnahme

Bei der Wahl des Vermessungspunktes stellte somit die CLSM den limitierenden Faktor dar, sodass der Punkt folglich an einer Artefakt-freien Stelle in der CLSM ausgewählt und anschließend in der OCT übertragen werden musste.

4.4.3 Vergleichende Messungen

Um die Übereinstimmung der beiden quantitativen Messmethoden (OCT und CLSM) zu überprüfen, wurde mittels MedCalc Statistical Software Version 18.11.6 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2019) die Bland-Altman-Plot-Methode (Bland-Altman-Diagramm) genutzt. Dabei galt die Histologie (CLSM) als Goldstandard, das heißt die Differenz beider Methoden (y-Achse) wurde in Prozent gegen den in der CLSM gemessenen Wert (x-Achse) aufgetragen. Die Ergebnisse für die Fovea centralis und die Fovea temporalis sind in Abbildung 61 und Abbildung 62, Seite 77-78 dargestellt.

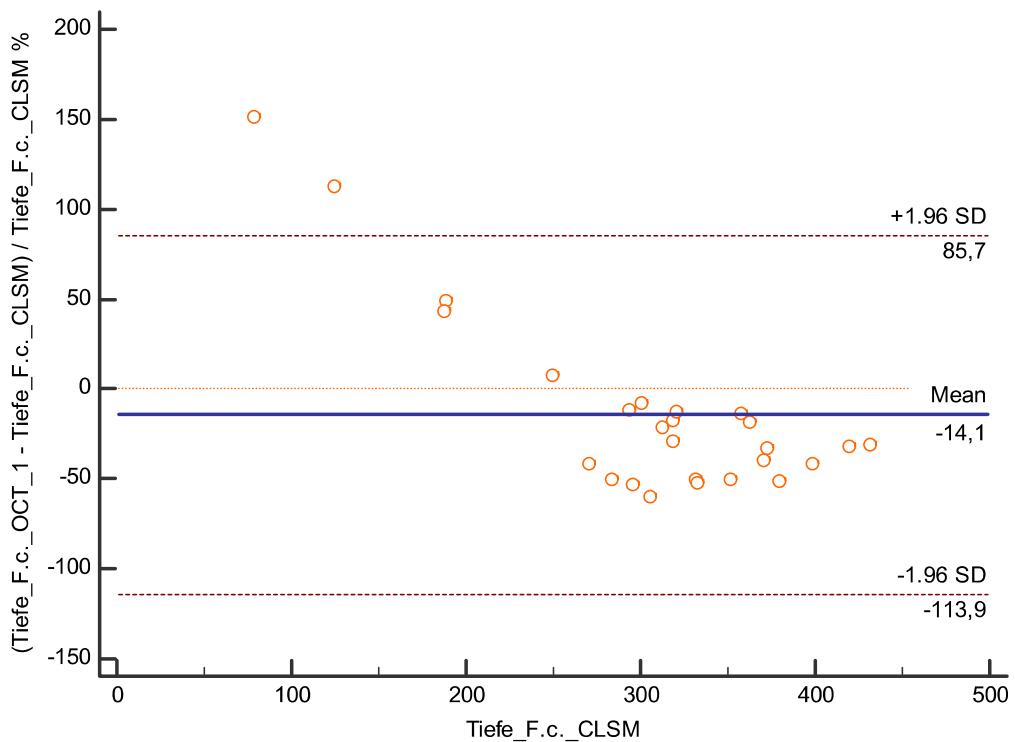


Abbildung 61: Bland-Altman-Plot: Tiefe der Fovea centralis

Rot gestrichelt: Nulllinie (liefern beide Messmethoden im Idealfall dasselbe Ergebnis, ergibt sich eine Differenz von 0); blaue durchgängige Linie: Mittelwert der Differenzen (Mean, Bias); Braun gestrichelt: Grenzen des Limits of Agreement (LoA). Die Grenzen werden mithilfe der Mittelwertsdifferenz (Mean) $\pm 1,96 \times$ die Standardabweichung (SD) (bei Annahme einer Normalverteilung) berechnet. Innerhalb dieser Grenzen befindet sich ein Konfindenzintervall von 95%.

Die 26 ermittelten Werte für die Tiefe der Fovea centralis ergaben ein Bias von -14,1 %. Liegt der Bias im negativen Bereich, bedeutet das, dass der mit der zweiten Messmethode erhaltene Wert (CLSM) größer ist, als bei der ersten Methode (OCT). Die gemessenen Werte in der Histologie waren somit im Durchschnitt um 14,1 % größer als in der OCT. Für die Fovea temporalis zeigte sich für die 15 durchführbaren Messungen ebenfalls ein negatives Bias von -6,7 % (siehe Abbildung 62, S. 78).

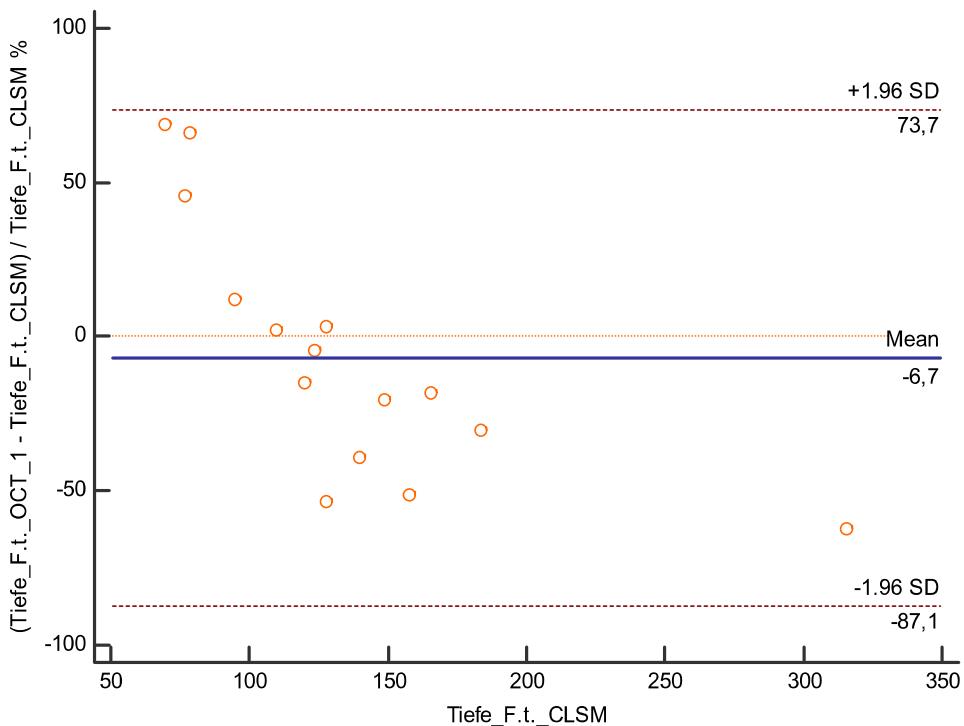


Abbildung 62: Bland-Altman-Plot: Tiefe der Fovea temporalis

Die in der Histologie erhaltenen Messwerte für die Tiefe der Fovea temporalis waren somit im Schnitt 6,7 % größer als in der OCT. Das Diagramm zeigt zudem eine sehr starke Streuung der Werte, im Vergleich zu den Messungen der Fovea centralis.

Bei der Durchführung der Schichtdickenmessungen konnten für die Schicht 1 (ILM + NFL + GCL) 57 Messungen durchgeführt und dargestellt werden. Es ergab sich ein Bias von -13,2 %. Der in der Histologie gemessene Wert war folglich um 13,2 % größer als in der OCT (siehe Abbildung 63, S. 79).

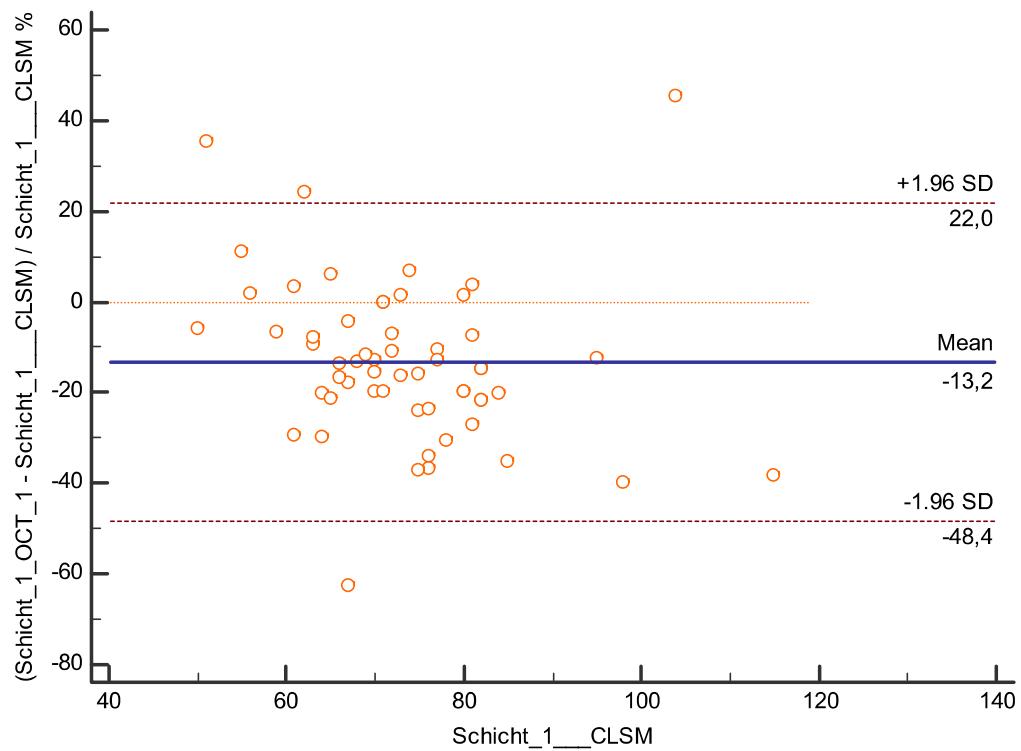


Abbildung 63: Bland-Altman-Plot, Schicht 1 (ILM + NFL + GCL)

Es fallen 3 Ausreißer auf, welche nicht mehr im Bereich des Limits of Agreement (-48,4 % bis 22 %) liegen. 55 Messungen konnten für die statistische Auswertung der Schicht 2 (IPL) eingehen. Dabei ergab sich ein erstmalig positives Bias von 40,9 % (siehe Abbildung 64). Die IPL war in der Histologie im Durchschnitt 40,9 % kleiner.

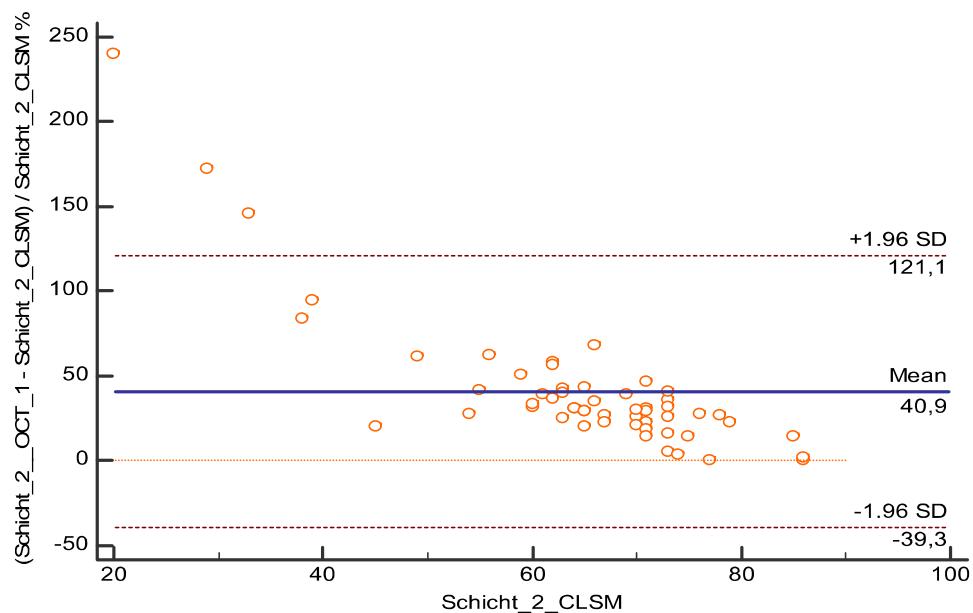


Abbildung 64: Bland-Altman-Plot: Schicht 2 (IPL)

Für die dritte Schicht (INL + OPL + ONL + ELM) konnten 57 Messungen durchgeführt werden. Der Bland-Altman-Plot zeigt ein Bias von 13,7 % (siehe Abbildung 65).

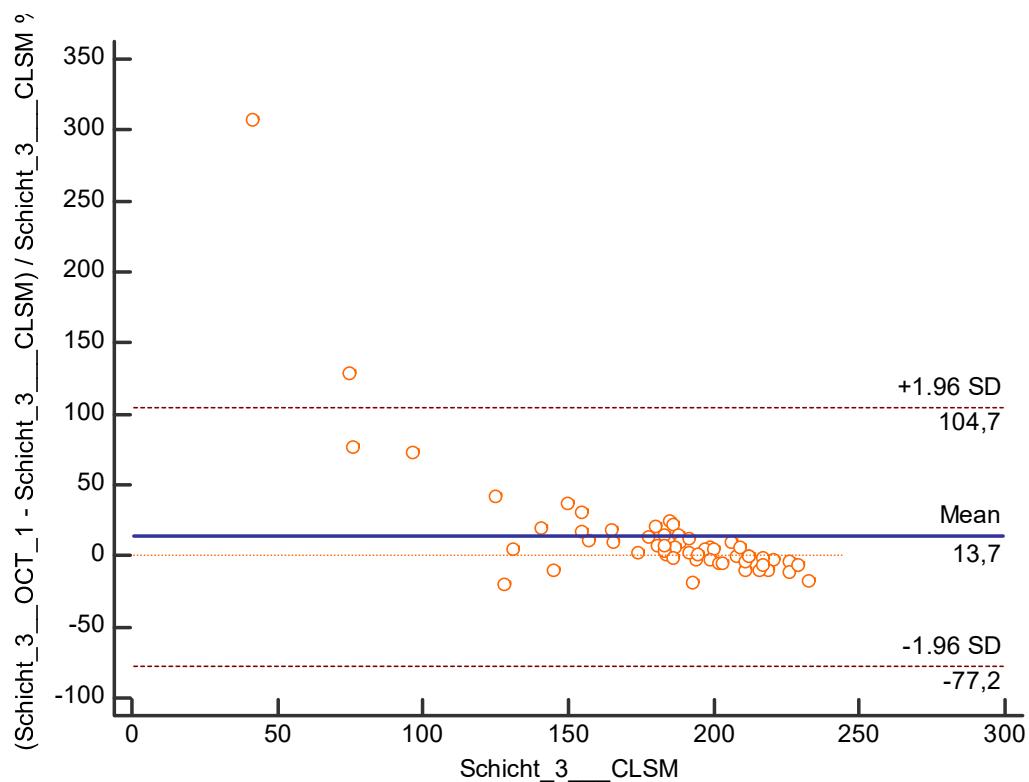


Abbildung 65: Bland-Altman-Plot: Schicht 3 (INL + OPL + ONL + ELM)

Die Streuung der Werte ist deutlich geringer als bei den ersten beiden Schichten und sie liegen nahe der Nulllinie (Idealfall), vor allem mit zunehmendem Dickenwerten der Schicht 3. Außerhalb der LoA befinden sich zwei Werte. In der Abbildung 66, Seite 81 ergab sich für die letzte Schicht 4 (IS der Zapfenschicht) ein Bias von 46,3 % (56 Messungen).

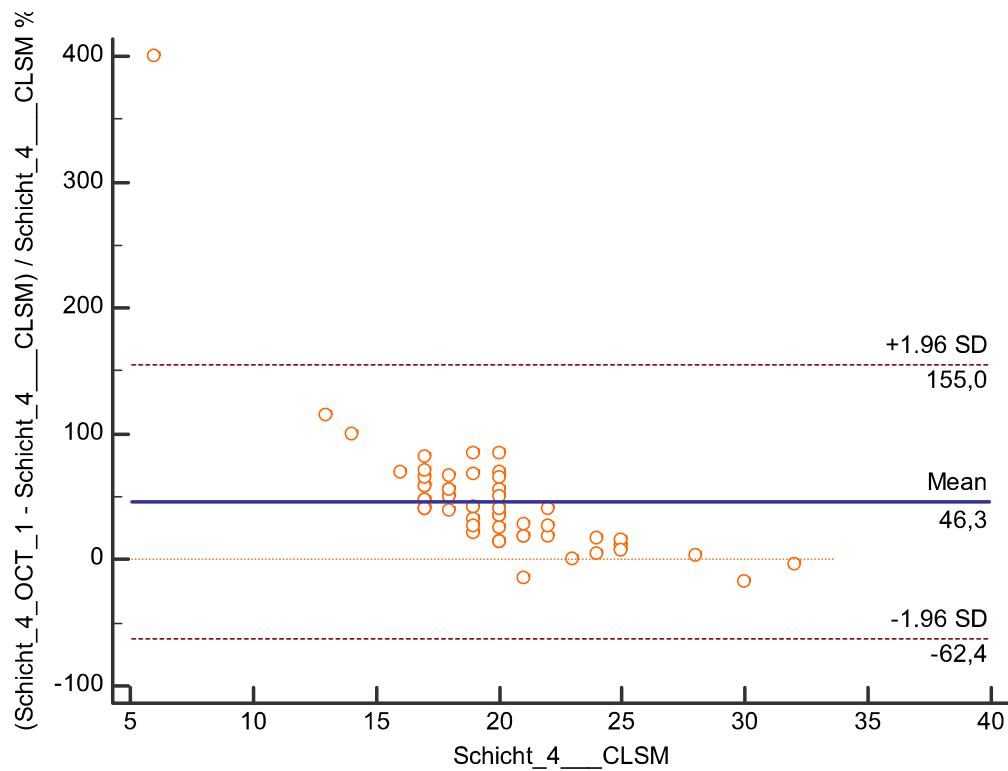


Abbildung 66: Bland-Altman-Plot: Schicht 4 (IS)

Es fällt lediglich ein Ausreißer außerhalb des LoA auf. Für die Gesamtdicke (ILM bis einschließlich IS) ergab sich aus 53 Messungen ein Bias von 6,8 % (siehe Abbildung 67).

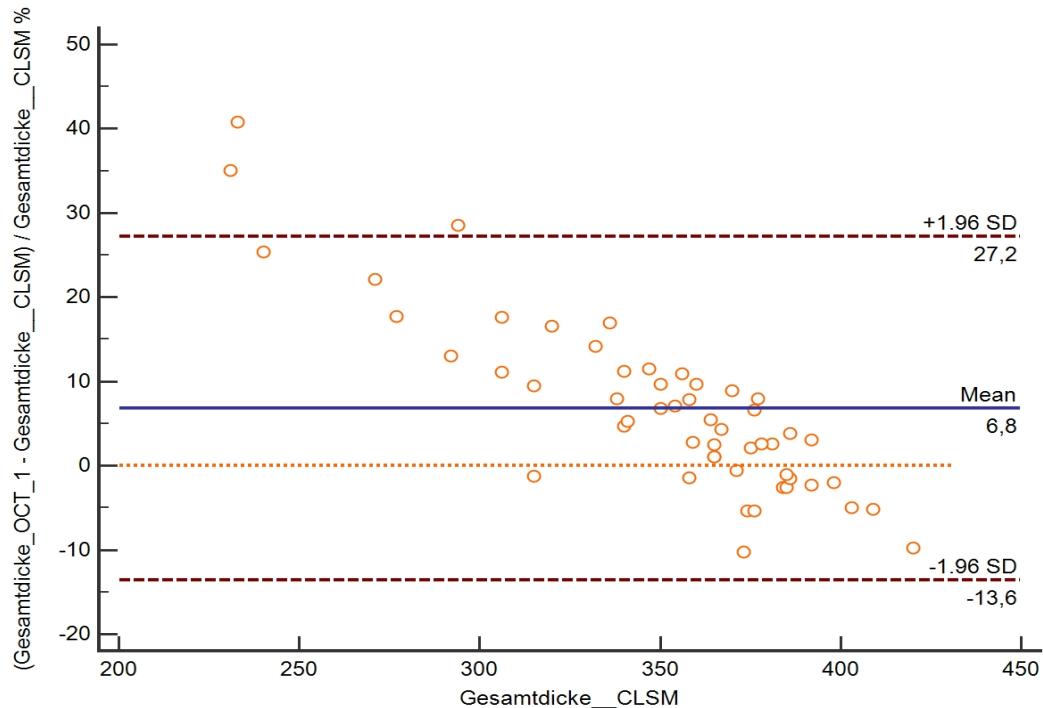


Abbildung 67: Bland-Altman-Plot: Gesamtdicke (exklusive OS/RPE)

Zusammenfassend betrachtet, traf eine annähernde Übereinstimmung der Werte nur für die Gesamtdicke und die Schicht 3 zu. Die in der Histologie gemessenen Werte waren meist kleiner als in der OCT, außer für die Tiefe der Foveae und die Schicht 1. Grundsätzlich bestand keine gute Übereinstimmung der Werte zwischen der OCT und der CLSM. Dünne Schichten wurden in der OCT im Allgemeinen überschätzt und dicke Schichten leicht unterschätzt.

4.4.4 Darstellung von pathologischen Prozessen

Bei zwei Waldkäuzen (*Strix aluco*) wurden aufgrund des OCT-Augenbefundes und der infausten Prognose, die Augen für eine histologische und immunhistochemische Untersuchung enukleiert. Die in der OCT detektierten pathologischen Befunde konnten mit der Histologie abgeglichen werden.

Waldkauz (*Strix aluco*) Nummer 1 zeigte fast am gesamten Fundus eine großflächige Retinaalteration, wie in Abbildung 68 zu sehen.

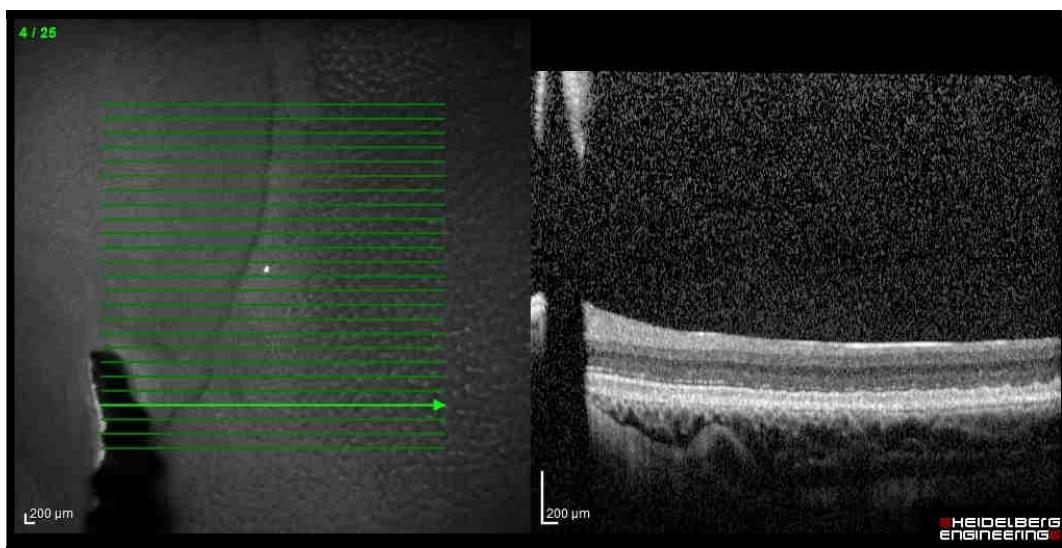


Abbildung 68: Oculus dexter des Waldkauzes (*Strix aluco*) 1

In der Fundusaufsicht ist nasal der Pectenspitze eine harte Begrenzung zum Retinadefekt sichtbar. Die Alteration stellt sich fleckig mit einem wolkigen Aussehen dar. Die Abbildung 69, Seite 83 zeigt den B-Scan der OCT im Vergleich zur CLSM an einer ähnlichen Lokalisation.

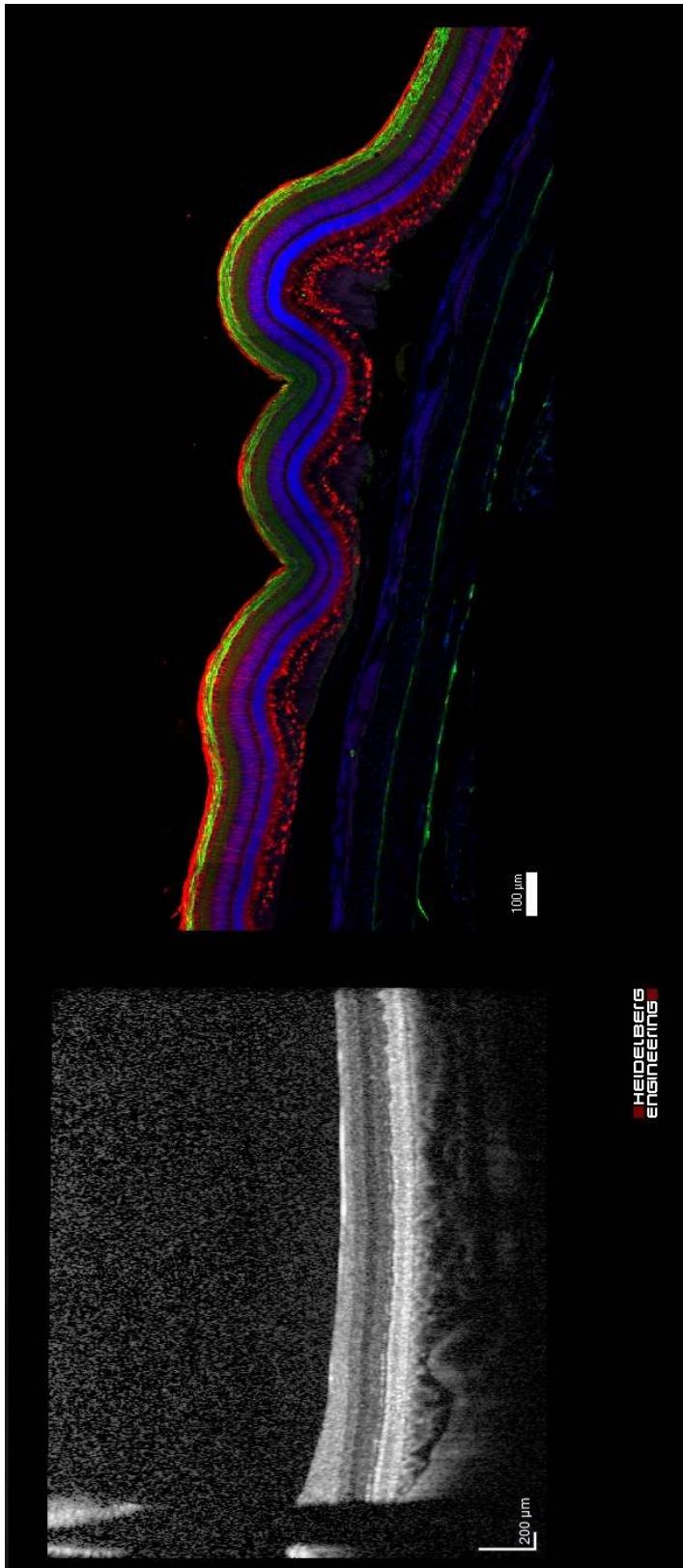


Abbildung 69: Vergleich OCT und CLSM des Waldkauzes (*Strix aluco*) 1, Oculus dexter

Die Abbildung zeigt den Längsschnitt in der OCT im Vergleich zur CLSM an einer ähnlichen Lokalisation. Im optischen Schnitt der OCT ist stellenweise eine Hyperreflektivität an der oberen Grenze der RNFL sichtbar. Die äußeren Schichten (ELM, IS/OS) sind aufgewellt. Die ELM ist teilweise unterbrochen, an anderen Stellen hyperreflektiv oder teilweise nicht mehr eindeutig differenzierbar. Im Vergleich hierzu lässt sich in der CLSM ein ähnliches Bild feststellen. Sämtliche Schichten sind wellenartig verzogen und vom RPE in diesen Bereichen abgelöst. Auffällig sind rot fluoreszierende Bereiche zwischen der ELM und der Zapfenschicht. Die Morphologie der Müllerzellen wirkt im Bereich der ELM verändert. Die Zapfenschicht liegt nicht mehr angrenzend an der ELM und es sind nur vereinzelt Zapfen detektierbar. Die ELM scheint durchgehend intakt.

Am OS desselben Tieres stellten sich in der OCT im Bereich der Pectenbasis und temporal hiervon kleine, helle Herde dar und eine Auffältelung der Retina. Die äußeren Retinaschichten zeigten hier ebenfalls einen wellenförmigen Verlauf. Das IS scheint stellenweise vom OS gelöst und die ELM an jenen Punkten hyperreflektiv. Besonders auffällig ist im Längsschnitt der Bereich des Glaskörpers: Hier befinden sich zahlreiche hyperreflektive Strukturen (siehe Abbildung 70).

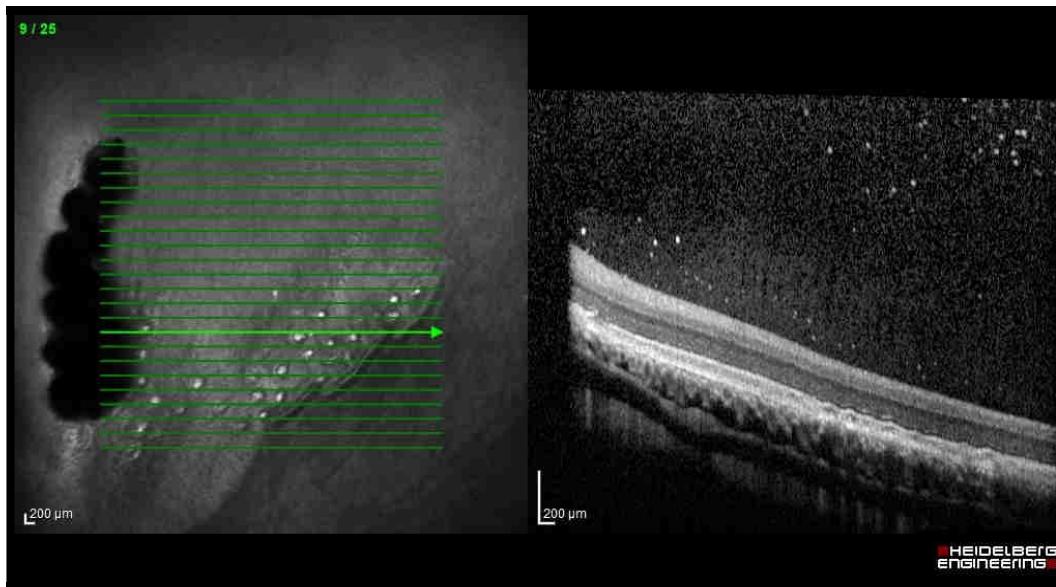


Abbildung 70: Oculus sinister des Waldkauzes (*Strix aluco*) 1

In der CLSM (siehe Abbildung 71, S. 85) ist die wellenförmige Verzerrung der Retinaschichten ebenfalls sichtbar. Die ELM ist durchgängig differenzierbar, wird aber in einigen Bereichen von morphologisch veränderten Müllergliazellen überlagert. Die ILM ist nicht vollständig intakt und Teile hiervon zusammenhangslos über der RNFL sichtbar. Es ist eine deutliche Färbung der Zapfen sichtbar, welche in den Bereichen der Abhebung deutlich verbreitert erscheinen. Der Abstand zwischen dem IS und OS ist hier größer und die Zilien des OS verlängert. Die Kernschichten sind unverändert. Auffällig ist in den Bereichen der Abhebungen eine starke blaue Fluoreszenz innerhalb und unterhalb der Zapfenschicht.

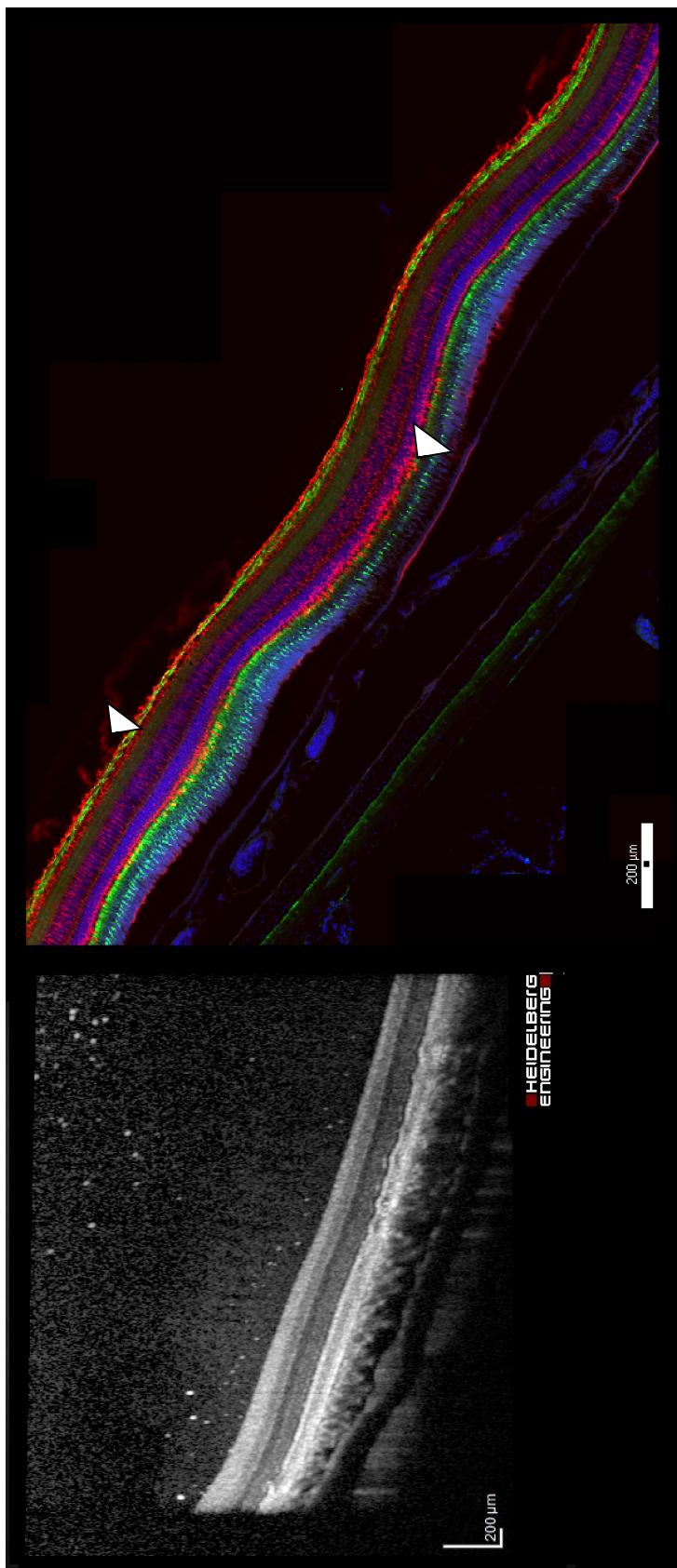


Abbildung 71: Vergleich OCT und CLSM des Waldkauzes (*Strix aluco*) 1, Oculus sinister

Im Bereich der Abhebungen ist zwischen den Zapfen eine starke blaue Fluoreszenz sichtbar. Oberer Pfeil: Teile der ILM außerhalb der Schichtung; Unterer Pfeil: Rot fluoreszierender Bereich unterhalb der ELM

Für einen weiteren Waldkauz ergab sich während der OCT-Untersuchung ebenfalls eine infauste Prognose. Nach einem Autounfall waren beidseits Einblutungen in die hintere Augenkammer detektierbar. Eine OCT-Untersuchung war nach der Resorption der Blutung möglich. Dabei zeigten sich am gesamten Fundus des rechten Auges großflächige Veränderungen (siehe Abbildung 72).

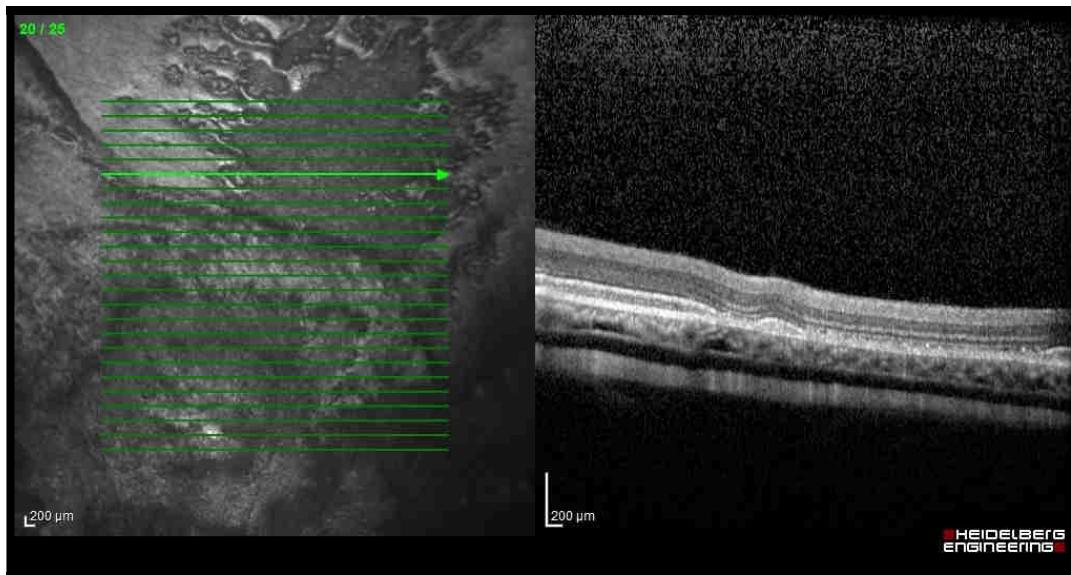


Abbildung 72: Oculus dexter des Waldkauzes (*Strix aluco*) 2

Am Fundus ist ein großer Defekt sichtbar, welcher sehr unruhig erscheint. Oberhalb der diffusen Veränderung, stellt sich eine scharf begrenzte, kraterförmige Veränderung dar. Der Längsschnitt zeigt einen Wellenschlag sämtlicher Retinaschichten. Das IS ist nur noch in bestimmten Bereichen vom OS abgrenzbar, sowie das OS vom RPE. Das IS scheint stellenweise aufgelöst. Die Gefäße in der Chorioidea sind deutlich gefüllt. In der CLSM (siehe Abbildung 73, S. 87) ist die Ablösung der Zapfenschicht vom RPE und die damit verbundene Faltenbildung der Retina wiederzufinden. Eine ILM ist nicht eindeutig abgrenzbar. Die Zapfenfärbung ist nur sehr schwach ausgeprägt und es sind vereinzelt zapfenähnliche Gebilde in der IPL zu finden. Die ELM wird stelleweise von veränderten Müllerglia überlagert, welche sich zwischen der ELM und der Zapfenschicht befinden. An den Stellen der Ablösung sind erneut rot fluoreszierende Bereiche sichtbar, die keine Verbindung zu den Müllergliazellen aufweisen. Im Choroid sind die stark gefüllten Gefäße sichtbar.

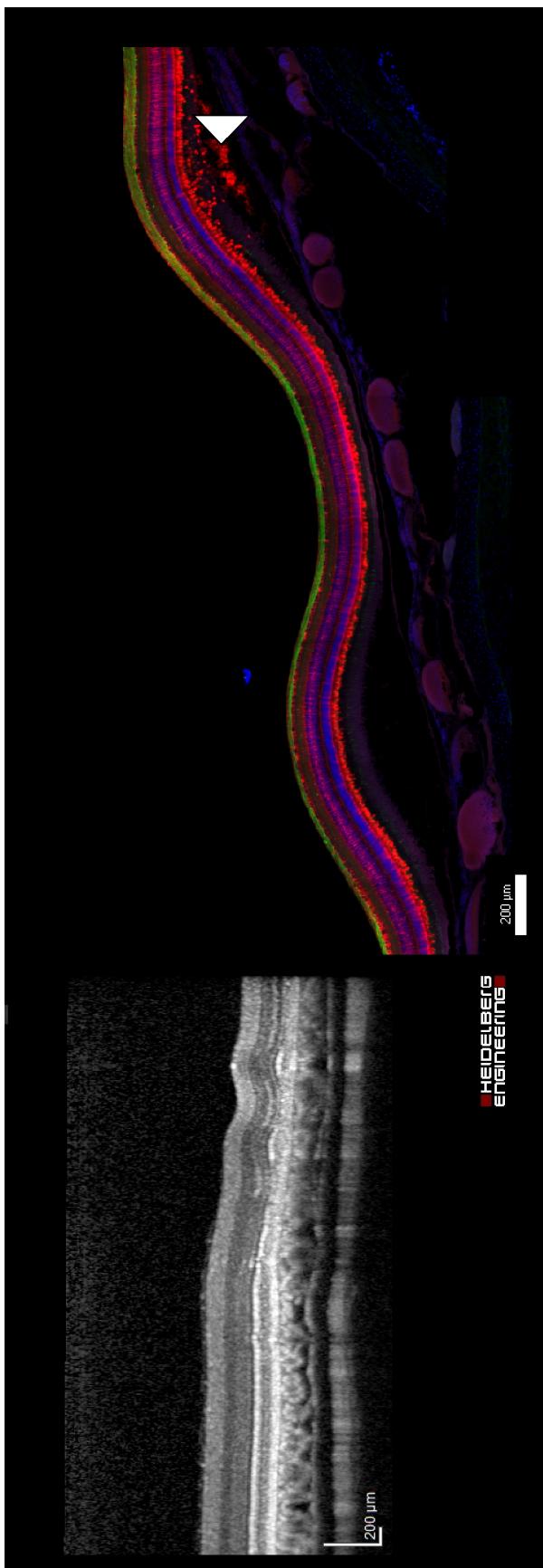


Abbildung 73: Vergleich OCT und CLSM des Waldkauzes (*Strix aluco*) 2, Oculus dexter

Auffällig ist im entstandenen Zwischenraum zwischen Zapfenschicht und RPE ein stark rot fluoreszierender Bereich (siehe Pfeil), dem keine Zellstruktur zugeordnet werden kann.

Am linken Auge waren ähnliche Veränderungen auffindbar, mit einem ähnlichen Bild im Längsschnitt. Zusätzlich ließen sich im Bereich der NFL hyperreflektive Bereiche detektieren (siehe Abbildung 74).

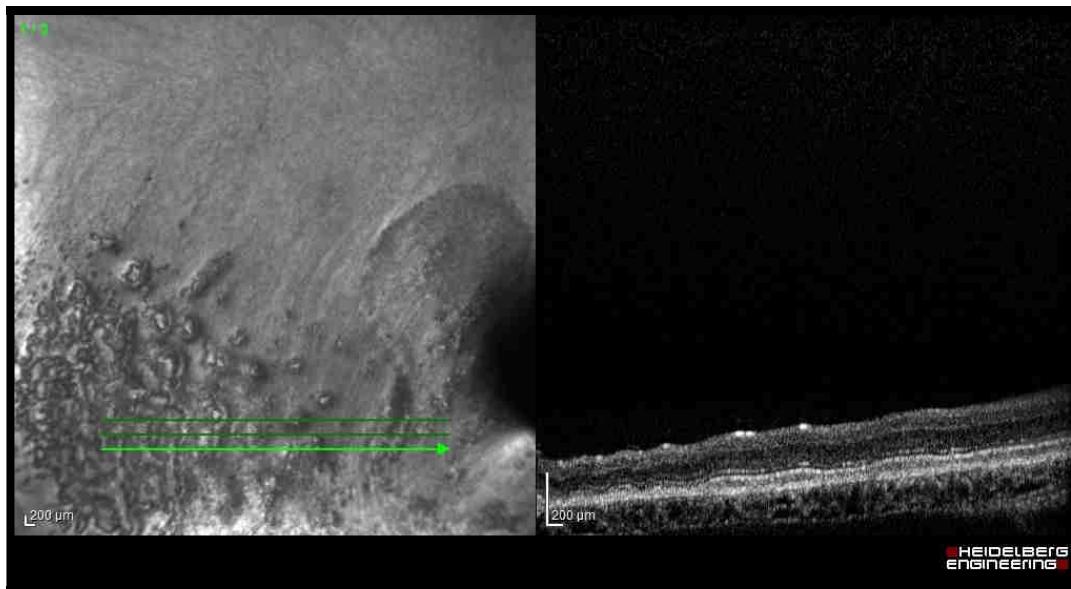


Abbildung 74: Oculus sinister des Waldkauzes (*Strix aluco*) 2

In der CLSM zeigen sich dieselben Veränderungen wie zuvor beim rechten Auge beschrieben (siehe Abbildung 75). Die ILM ist nicht immer sichtbar und in ihrer Dicke sehr irregulär. Zapfen sind nur vereinzelt auffindbar und in den Bereichen der Ablösung nicht aufzufinden. Die ONL ist stellenweise hochgradig reduziert und nicht mehr vollständig.

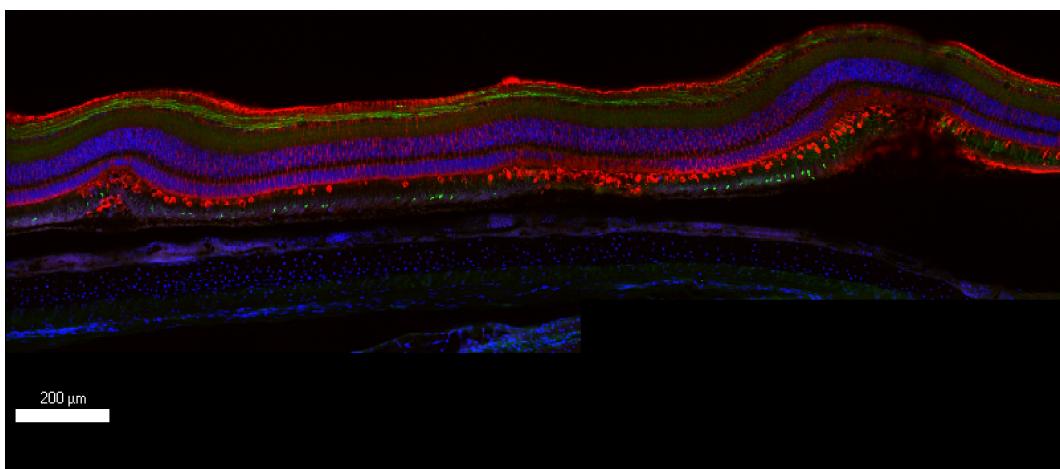


Abbildung 75: CLSM des Waldkauzes (*Strix aluco*) 2, Oculus sinister

In einem weiteren Fall wurde ein klinisch blinder Weißkopfseeadler weiterführend untersucht. Die ophthalmologische Untersuchung ergab einen hochgradigen Nystagmus und eine Katarakt beidseits. Die indirekte Ophthalmoskopie brachte

keine besonderen Befunde. Die Untersuchung mittels der OCT war durch den Nystagmus und der Katarakt nahezu unmöglich. Die Aufnahme von aussagekräftigen OCT-Bildern somit nicht umsetzbar. Für die CLSM der Retina wurde ein Auge entsprechend präpariert. Die Histologie ergab mehrere Auffälligkeiten. Als Vergleich wurde die physiologische Retina eines Habichts, als ein weiterer Vertreter der Familie der Accipitridae, herangezogen.

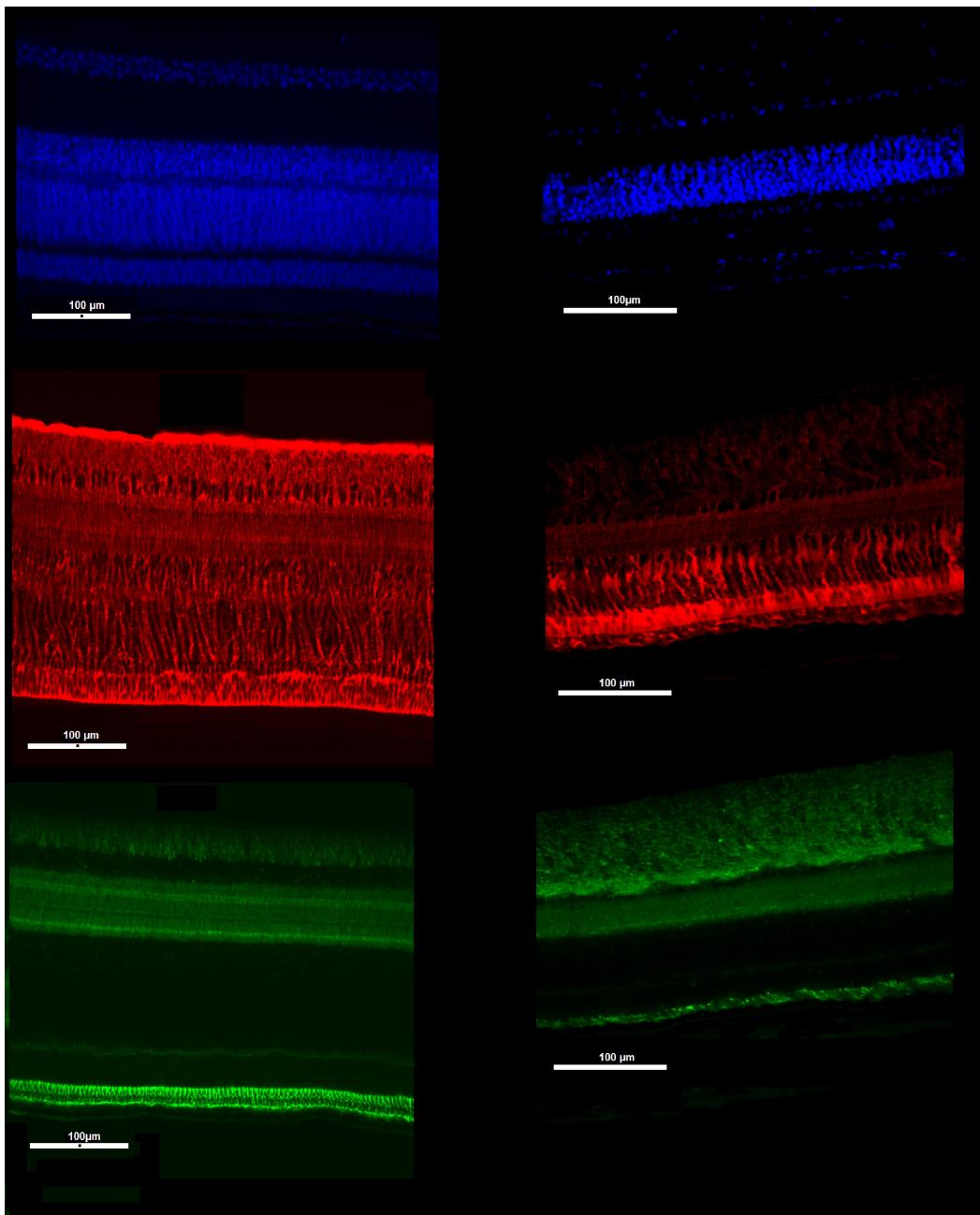


Abbildung 76: Pathologische Retina eines Weißkopfseeadlers (*Haliaeetus leucocephalus*)

Links: Physiologische Retina eines Habichts; Rechts: Pathologisch veränderte Retina eines Weißkopfseeadlers (*Haliaeetus leucocephalus*)

In der Abbildung 76, Seite 89 wird eine Veränderung der Kernschichten sichtbar. Die GCL ist nicht mehr intakt, die Zellkerne sind herausgelöst und befinden sich diffus verteilt in der Peripherie. Auch in der INL sind Unterbrechungen der Kernschicht sichtbar. Es sind nur noch weniger Kerne in der ONL zu sehen, welche diffus angeordnet sind. Im Vergleich zum Habicht fällt die INL sehr viel dünner aus. Bei der Färbung der Müllergliazellen ist nur eine sehr schwache Markierung im Bereich der NFL vorhanden. Es stellt sich lediglich eine leichte und diffuse Rotfärbung dar, die Ausläufer der Müllergliazellen sind nicht vollständig nachvollziehbar. Unterhalb der ELM ist zusätzlich eine Rotfärbung zu erkennen, die auf eine Hypertrophie und Proliferation der Müllerzelle hindeutet. Die Müllerzielen wirken elongiert. Eine ILM, sowie die NFL, fehlen vollständig. Zapfenzellen sind nur unvollständig erkennbar. In der Dreifachfärbung ist die Abweichung vom physiologischen Bild eines Habichts erneut sehr deutlich zu sehen (siehe Abbildung 77).

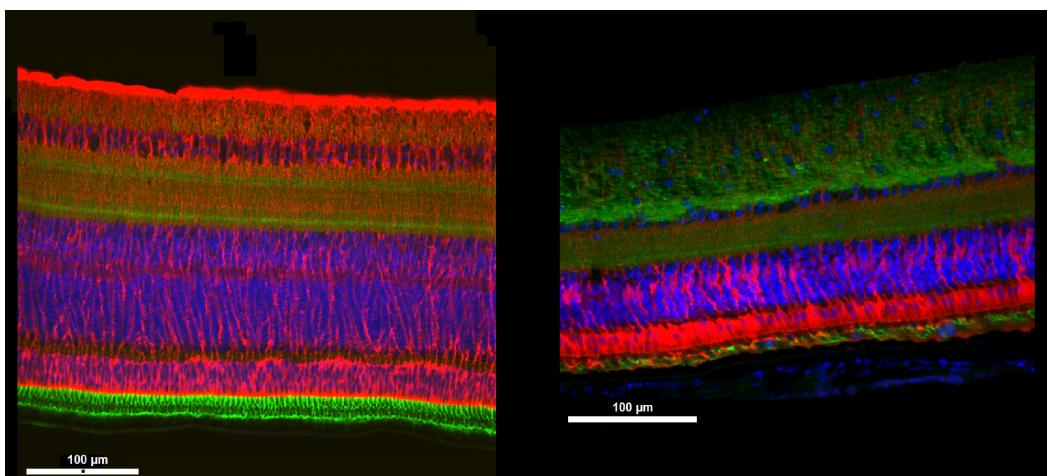


Abbildung 77: Multicolorfärbung pathologische Retina eines Weißkopfseeadlers (*Haliaeetus leucocephalus*)

Insgesamt zeigt die Retina des Weißkopfseeadlers (*Haliaeetus leucocephalus*) degenerative Veränderungen.

Abnorme Augenbefunde wie eine Katarakt, Hyphäma oder Nystagmus erschwerten die OCT-Untersuchung oder machten diese gar unmöglich. Für einige pathologische Zustände erwies sich die OCT somit als nicht praktikable Methode zur Beurteilung der Netzhaut.

V. DISKUSSION

Die OCT ist eine nicht invasive und kontaktfreie Technik zur Darstellung mikroanatomischer Strukturen. Durch die Nutzung eines Lasers werden Gewebestrukturen mithilfe ihrer unterschiedlichen Brechungs- und Streuungseigenschaften dargestellt. Die erhaltenen Aufnahmen erinnern dabei an histologische Schnitte. Das Hauptgebiet der OCT ist die Ophthalmologie. In der Humanmedizin gilt sie als Goldstandard zur Erkennung von Retinopathien. In den letzten Jahren nahm auch das Interesse in der Tiermedizin am Einsatz der OCT zu. Besonders bei (Wild-) Vögeln, für die die Sehkraft eine überlebenswichtige Rolle spielt, ist der Einsatz der OCT von besonderem Interesse. Inwieweit die OCT-Bilder des für die Humanmedizin entwickelten Geräts mit denen der mikroskopischen Anatomie übereinstimmen muss evaluiert werden, um die Aussagekraft bestimmen zu können. Die zahlreichen Besonderheiten des Vogelauges, im Vergleich zum Säuger, machen eine solche Validierung der OCT dringend notwendig. Einige Studien beschreiben bereits einen qualitativen Vergleich mit der Histologie (Y. HUANG et al., 1998; MOAYED et al., 2011; RAUSCHER et al., 2013). Kenntnisse zu einem quantitativen, aussagekräftigen Punkt-zu-Punkt Vergleich zwischen der OCT und der Histologie in der aviären Augenheilkunde fehlen bislang in der Literatur. Mit der vorliegenden Studie wurde erstmals ein derartiger quantitativer Vergleich durchgeführt. Dabei konnten 30 physiologische Augen erfolgreich histologisch vermessen und der OCT gegenübergestellt werden. Es wurden erstmals Folgeuntersuchungen an Greifvögeln und Eulen dokumentiert und einige der pathologischen Veränderungen mit der Histologie abgeglichen.

5.1 Material- und Methodenteil

5.1.1 Patientengut und OCT-Untersuchung

Für die Fixation während der OCT-Untersuchung wurde die Methode nach SIGG (2016) angewandt, welche sich für sämtliche Patienten eignete. Alle Patienten wurden wach und unter der Verwendung einer leichten manuellen Fixation (Einwickeln in ein Handtuch und Fixation der Ständer) untersucht. RAUSCHER et al. (2013) führte beispielsweise alle OCT-Untersuchung an Greifvögeln unter Anästhesie und AZMANIS et al. (2015) wahlweise mit Sedation und Fixationsvorrichtungen durch. Die verwendeten Untersuchungs-, beziehungsweise Fixationstechniken der vorliegenden Studie und die hierbei

gewonnenen, reproduzierbaren OCT-Ergebnisse zeigen, dass eine Untersuchung ohne Sedation und mit minimaler Fixation bei Vögeln möglich ist und dabei qualitativ ausreichende Bildergebnisse erzielt werden können. Eine induzierte Mydriasis mithilfe von Curarederivaten war für die Aufnahme mittels OCT in der vorliegenden Studie nicht notwendig. Die partielle Weitstellung der Pupille durch die Abdunklung des Raums und die Schreckmydriasis der Eulenvögel war hierfür ausreichend. Es ist davon auszugehen, dass auch für andere Vogelarten eine induzierte Mydriasis mittels Parazentese oder Anästhesie für eine OCT-Untersuchung nicht notwendig ist. Die Untersuchung wurde von allen Tieren sehr gut toleriert. Lediglich bei einem Sperber mit einer Wirbelsäulenfraktur traten, trotz Analgesie (Butorphanol 4mg/kg KM), langanhaltende Abwehrbewegungen und eine zunehmend angestrengte Atmung auf. In diesem einen Fall musste die Untersuchung abgebrochen werden. Die OCT am Auge des Vogels kann insgesamt als stressarmes und damit auch tierschutzrechtlich mit einem geringen Belastungsfaktor zu belegenden Verfahren angesehen werden. Es ist jedoch wichtig anzumerken, dass Beutegreifer von Natur aus weniger stressempfänglich sind als andere Arten, vor allem Beutetiere. Aber auch innerhalb der Greifvogelarten zeigten sich individuelle Unterschiede. So zeigten Sperber und Turmfalken beispielsweise ein erregteres Gemüt und vermehrte Bewegungen des Kopfes, welche die Untersuchung erschwerten. Insgesamt konnte jedoch am wachen Patienten kein signifikanter Unterschied in Hinblick auf die Untersuchungsdauer am sedierten/anästhesierten Patienten im Vergleich zu anderen Studien festgestellt werden (Minimum 2 Minuten pro Auge bis maximal 7 Minuten). Die Entscheidung ob eine Sedierung oder gar Anästhesie notwendig ist, muss individuell von den Ergebnissen der klinischen Untersuchung und der Vogelart getroffen werden. Gleiches gilt für die Wahl der Fixationstechnik. Bei allen untersuchten Vögeln war zwar eine leichte manuelle Fixation durch eine Person ausreichend, bei der Untersuchung deutlich kleinerer Vögel wie von MOORE et al. (2018) bei Schwarzkinnkolibris (*Archilochus alexandri*) oder größerer Vertreter wie z. B. eines Seeadlers (*Haliaeetus albicilla*) bei AZMANIS et al. (2015) sehen wir jedoch zusätzliche Fixationsmaßnahmen wie Vorrichtungen oder weitere Hilfspersonen ebenfalls als notwendig an. Eine Anpassung der Fixation aufgrund von artspezifischen Verhaltensweisen (z. B. die Tendenz von Eulenvögeln bei der Handhabung die Augen geschlossen zu halten) muss ebenfalls berücksichtigt werden. Es obliegt zukünftigen Studien, in wie weit und mit welcher Fixationstechnik die OCT-Untersuchung für weitere Vogelspezies, vor allem Psittaziden, umsetzbar ist.

Bei der Darstellung des Augenhintergrundes musste für die Aufnahme der Foveae, vor allem der Fovea temporalis, ein sehr schräger Winkel des Kamerakopfes zum Auge gewählt werden. Im Idealfall sollte der Laserstrahl der OCT immer im selben Winkel und idealerweise im 90°-Winkel auf das Auge treffen. Es ist somit davon auszugehen, dass die okularen Schichten, durch den schrägen Auftreffwinkel, verzerrt erscheinen, was zu Ungenauigkeiten bei Messungen führt. Die Auflösung des SPECTRALIS® HRA+OCT der Firma Heidelberg Engineering (Heidelberg, Deutschland) wird in der Studie für eine Dickenmessung der einzelnen Retinaschichten als nicht ausreichend beurteilt. Um die Grenzen der einzelnen Schichten besser bestimmen zu können, mussten die Aufnahmen vergrößert werden, damit ging jedoch auch eine zunehmende Unschärfe und Rauschen des Bildes einher, was ebenso zu Messungenauigkeiten innerhalb des OCT-Bildes führen kann. Es ist zu beachten, dass die Berechnungsgrundlage für Messungen innerhalb der Heidelberg Eye Explorer 1.10.2.0 Software der OCT auf die Annahme eines Gullstrand-Augen beruht, von dem sich das Vogelauge erheblich unterscheidet. Vor allem der Kornearadius und die -krümmung unterscheiden sich bei den Vögeln erheblich. Innerhalb der OCT wird ein menschlicher Hornhautradius von 7,7 mm angenommen. Dieser Wert kann zwar angepasst werden, dabei fällt jedoch auf, dass sich nur die horizontalen Messwerte (Abstandsmessungen zur Fovea) verändern, vertikale Messungen (Messung Schichtdicken) aber unverändert bleiben. Weiterhin unterscheiden sich die Brechungsindizes und die axiale Länge des Bulbus von Mensch und Vogel gravierend. Welchen Einfluss diese Parameter auf Messungen am Augenhintergrund haben, kann nicht beurteilt werden. GIANI et al. (2010) merkt zudem an, dass die erhaltenen Werte stark vom verwendeten OCT-Gerät abhängig sind und SEIBOLD und KAHOOK (2012) stellten einen minimalen Unterschied beim Einsatz verschiedener Softwareversionen fest.

5.1.2 Enukleation und Fixation der Retina

Die empfohlene Enukleation von SAUNDERS und JUBB (1961) in weniger als 5 Minuten war mithilfe der abgewandelten Methode für die meisten Vogelaugen umsetzbar. Die vorliegende Studie zeigt jedoch auf, dass die anatomischen Besonderheiten der Vogelaugen eine Enukleation erheblich erschweren. Die tubuläre Augapfelform der Eulenvögel stellte für die Enukleation ohne Verletzung des Bulbus eine Herausforderung dar. Die empfohlene Enukleationszeit war für diese Art nicht umsetzbar. Zudem war bei Vogelarten mit einem stark ausgeprägten Processus supraorbitalis (z.B. Habicht) die Enukleation innerhalb

des Zeitrahmens ebenfalls erschwert. Trotz der verzögerten Fixation bei den genannten Spezies, konnten keine unerwünschten Effekte auf anschließende Auswertungen festgestellt werden. In der vorliegenden Studie wurden verschiedene Fixationsmethoden für die aviäre Retina evaluiert. Dabei stellte sich Davidson gegenüber Formalin als bessere Wahl zur Fixation dar und die Aussagen von MCKAY et al. (2009), LATENDRESSE et al. (2002) und MOREIRA-NETO et al. (2019) konnten somit bestätigt werden. Entgegen der Studie von CHIDLOW et al. (2011) hielten die Formalin-fixierten Schnitte schlechter auf den Objektträgern bei weiteren Verarbeitungs- und Waschschritten als bei der Fixation mit Davidson. Zudem konnten entgegen den Beschreibungen keine Schwierigkeiten beim Schneiden der Davidson-fixierten Retinaproben beobachtet werden. Ein Einbringen der Fixierlösung in das Augeninnere über Parazentese erwies sich als zwingend erforderlich für eine anschließende histologische Untersuchung, da es sonst unweigerlich zu hochgradigen Retinalterationen kam (RAVELHOFER, 1996; DOROBEK, 2013; LIEPERT, 2013). Eine hierdurch bedingte Retinaatrophie und damit verbundene Einflüsse auf anschließende Schichtdickenmessungen wurde in der Studie hingenommen, um einen bestmöglichen Erhalt der Retinamorphologie zu gewährleisten. Die vorliegende Arbeit lehnt einen Einschnitt in den Limbus, wie ihn KUNERT et al. (1999) oder VELASCO GALLEGOS (2015) zur Erleichterung der Diffusion des Fixativs durchgeführt haben, ab, da die Retinamorphologie in den durchgeföhrten Versuchen nicht ausreichend erhalten war. Mit der durchgeföhrten Fixationsmethode (Parazentese des Auges mit Davidson) konnten dennoch artifizielle Artefakte, wie eine Faltenbildung, Quellung oder Ablösung der Retina nicht vollständig vermieden werden. Dem könnte durch ein wiederholtes Einbringen der Fixierlösung in das Augeninnere, wie in der Studie von LIEPERT (2013) beschrieben, entgegen gewirkt werden. Bei der Bestimmung der Schrumpfung durch die histologischen Methoden ergaben sich sehr unterschiedliche Werte. Das Volumen der Bulbi sank nach der Fixation um 3,3 %, der Korneadurchmesser dagegen nahm um 1,6 % zu. Grund hierfür ist die nicht einheitliche Schrumpfung des Auges, wie zuvor schon von WERTHER et al. (2011) bei der Fixation von Vogelaugen beschrieben. Es ergeben sich unterschiedliche Werte für eine vertikale und horizontale Schrumpfung (XIE et al., 2018). Die Zunahme des Korneadurchmessers in der vorliegenden Studie kann auf eine Quellung bestimmter Strukturen zurückgeführt werden. TRAN et al. (2017) beschreibt ähnliche Vorgänge bei einer Formalinfixation von Schweineaugen. VELASCO GALLEGOS (2015) stellte bei der Messung der Gesamtdicke der Retina von Greifvögeln (ILM bis RPE) eine Schrumpfung von

bis zu 25 % fest. In der vorliegenden Arbeit haben die vertikalen Messungen der Gesamtdicke einen deutlich kleineren Wert von 6,8 % für die Schrumpfung ergeben. Allerdings wurde das RPE nicht mit in die Berechnungen einbezogen. Dieser Umstand kann durch die unterschiedliche histologische Verarbeitung der Proben (Kryoschnittechnik vs. Paraffineinbettung) erklärt werden.

5.1.3 Anwendung der Immunhistochemie für die aviäre Retina

Für eine optimale Antigenerhaltung wurden Gefrierschnitte an einem Kryostaten durchgeführt. Hierfür wurden verschiedene Schichtdicken für eine anschließende immunhistochemische Verarbeitung erprobt. Dabei erwies sich eine Schnittdicke von 25 µm als praktikabel und ausreichend stabil. Beim Auffangen der Schnitte kam es dennoch unweigerlich zu leichten Verzerrungen des Schnittes auf dem Objektträger. Das Auffinden der Foveae gestaltete sich als schwierig, durch eine vermehrte Instabilität und Faltenbildung in diesem Bereich. Eine orthograde Schnittrichtung konnte nicht gewährleistet werden. Aus den genannten Gründen war es nicht möglich sicherzustellen, die Fovea im tiefsten Punkt zu kalottieren. Besonders die Fovea temporalis war schwer detektierbar, da sie in Ihrer Breite kleiner ist. Alle aufgezählten Nachteile der histologischen Prozedur führen zu unvermeidbaren Ungenauigkeiten bei anschließenden Messungen. Insgesamt konnten von 50 Augen nur bei 29 die Fovea centralis und bei 17 die Fovea temporalis aufgefunden werden. Die restlichen Augen konnten für die vergleichenden Messungen nicht verwendet werden, da hier eine Orientierung für eine Punkt-zu-Punkt Vermessung und ein Vergleich mit der OCT nicht möglich war. In der Studie wurde zum ersten Mal ein vollständiges Protokoll zur immunhistochemischen Färbung der Müllergliazellen und Zapfenzellen der aviären Retina für tagaktive Greifvögel und nachtaktive Eulen dargestellt. BLANKS und JOHNSON (1984) beschreiben die Färbung der Zapfen bereits bei Hühnern (*Gallus gallus*) und RAUSCHER et al. (2013) eine immunhistochemische Markierung der Müllerglia, Zellkerne und Zapfen bei einem Mäusebussard (*Buteo buteo*). In der vorliegenden Arbeit konnte mithilfe dieser Studien ein Protokoll etabliert und für alle untersuchten Vogelarten erfolgreich angewendet werden. Es bleibt zu überprüfen, ob dies für weitere Arten wie beispielsweise Psittaziden übernommen werden kann. Das aufgetretene Problem der starken Autofluoreszenz der Retina wurde bisher in keiner weiteren Studie erwähnt. Ursachen bei Säugern sind beispielsweise das in der Retina vorkommende Pigment Lipofuszin, das Einbettungsmaterial oder speziesabhängige Faktoren (NEUMANN und GABEL, 2002). Die vorliegende Autofluoreszenz in der vorliegenden Studie ist wahrscheinlich auf die gewählte

Fixation zurückzuführen. Die von NEUMANN und GABEL (2002) beschriebene Methode zur Reduzierung der Autofluoreszenz war sehr gut umsetzbar. Auffällig war jedoch, dass die Autofluoreszenz nach einer gewissen Zeit wieder einsetzte, sodass die Aufnahmen möglichst direkt nach der Immunmarkierung stattfinden sollten. Die verwendeten Antikörper Anti-Glutamin-Synthetase und PNA führten zu der gewünschten spezifischen Markierung der gesuchten Strukturen. BLANKS und JOHNSON (1984) beschreiben bei dem Einsatz von PNA neben einer Zapfenfärbung eine zusätzliche Färbung der Axone in der NFL, sowie eine Markierung der OPL. Dies konnte in der vorliegenden Studie ebenfalls beobachtet werden. Die Markierung der Zapfen mit PNA ermöglichte eine gute Differenzierung des IS vom OS. Das OS stellte sich häufig vom RPE gelöst dar, sodass eine Bestimmung der unteren Grenze nicht immer möglich war. Bedingt durch die Augenentwicklung und der Bildung der inneren und äußeren Retinaschicht ist die Sollbruchstelle zwischen der Zapfenschicht und dem RPE ein bekanntes und unvermeidbares Problem bei der histologischen Untersuchung der Netzhaut. Die Aufnahme mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop und die Aufnahme eines 3D-Stapels, brachte den Vorteil, dass Schichten in der Tiefe verfolgt werden konnten. Dies war besonders bei Artefakten sehr hilfreich, um Schichtgrenzen genauer definieren zu können.

5.2 Ergebnisteil

5.2.1 Differenzierung der Retinaschichten

Sämtliche histologisch bekannte Schichten der aviären Retina sind, bis auf die ILM, in der OCT differenzierbar. Es ist anzunehmen, dass sowohl die ILM als auch die NFL sehr ähnliche optische Eigenschaften besitzen, da sie als eine einheitliche Schicht rückreflektieren. Die GCL kann nicht immer separat und nur in Foveanähe beobachtet werden, wie bereits RUGGERI et al. (2010) feststellte. Da die Axone der Müllergliazellen die Zellkerne der Ganglienzellen umschließen, nimmt die vorliegende Studie an, dass sich aus diesem Grund die NFL und die GCL in der OCT zusammen darstellen. Die stärker streuende NFL reduziert sich zur Fovea hin, sodass es nahe liegt, dass die GCL hierdurch in Foveanähe besser differenzierbar erscheint, da sie weniger stark überlagert wird. Die Grenzen der äußeren Schichten (ONL, OPL, IS/OS, RPE) waren in der vorliegenden Arbeit weniger gut differenzierbar als die Inneren. Auch dieser Umstand ist bereits aus vorangegangen Studien bekannt (FERGUSON et al., 2014; MCKIBBIN et al., 2014; SCHULZE, 2016). Grund hierfür könnte die maximale Scantiefe im Gewebe von 1.9 mm des verwendeten OCT-Geräts sein,

welche für eine genaue Differenzierung tieferer Schichten nicht auszureichen scheint. Dagegen spricht jedoch, dass die Gesamtdicke der Retina in Foveanähe sich zwischen den einzelnen Individuen und Arten kaum unterschied ($\pm 100 \mu\text{m}$) und relativ konstant war (durchschnittlich $300 \mu\text{m}$). Die Grenzen der äußeren Schichten stellten sich dennoch unterschiedlich gut dar. Die vorliegende Studie lässt die Vermutung zu, dass der Hauptgrund hierfür darin besteht, dass die tieferen Schichten, wie die ONL oder OPL, dünner sind als die analogen inneren Schichten (INL, IPL) und in Verbindung mit einer nicht ausreichenden Auflösungsleistung des Geräts weniger gut differenzierbar sind. Dies wird ebenso der Grund sein, warum bei Eulen eine Differenzierung ab der OPL in der vorliegenden Arbeit nicht möglich war. Die ONL bei den Eulen stellt sich jedoch nicht dünner als die INL dar. Beide Schichten sollten somit im selben Maße differenzierbar sein. Womöglich spielt, wie ebenso in der vorliegenden Studie gezeigt, die abweichende Morphologie der Müllergliazellen bei den Eulen eine Rolle. Die OCT ist von den optischen Eigenschaften der Zellstrukturen abhängig und kleinste Veränderungen beeinflussen die Darstellung erheblich. Die Darstellung und Grenzen des IS/OS sowie des RPEs sind nicht eindeutig geklärt und werden in vielen Studien hinterfragt (ABBOTT et al., 2009; R. F. SPAIDE und CURCIO, 2011; RICHARD F. SPAIDE, 2012). Die vorhanden Öltropfen in den aviären Zapfen und das Vorkommen von Zwillingszapfen könnten die Reflexionseigenschaften der Zapfenschicht zusätzlich verändern (RAUSCHER et al., 2013). Zudem wird die artspezifische Variation der Anzahl von Stäbchen und Zapfen eine große Bedeutung haben (RUGGERI et al., 2010). In der vorliegenden Studie waren meist zwei Banden innerhalb der Photorezeptorenschicht sichtbar, seltener drei. Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei der weniger stark streuenden Bande unterhalb der ELM um das Myoid der Zapfen handelt, gefolgt vom stark streuenden Ellipsoid, welches sich nicht immer separat vom OS darstellt (Y. HUANG et al., 1998; R. F. SPAIDE und CURCIO, 2011). Das OS ließ sich, bis auf ein paar Ausnahmen, nicht vom RPE unterscheiden, sodass in der vorliegenden Studie angenommen wird, dass beide Schichten zu ähnlichen optischen Eigenschaften besitzen, um eine Differenzierung zu ermöglichen. Mit seiner welligen Erscheinung war angrenzend die Choroidea zu sehen. Die Schnittstelle zur Sklera (CSI) und der knorpelige Teil der Sklera (CS) waren meist nicht sichtbar. Hierbei könnte die Anwendung der „enhanced depth imaging“ - Option des OCTs bessere Ergebnisse erzielen (WONG et al., 2011). BERGER et al. (2014) beschreibt eine deutlichere Darstellung der genannten Strukturen bei Albinomäusen. Auffällig war in der vorliegenden Arbeit, dass bei Eulen der Studie die CSI und die CS in allen Fällen

klar abgrenzbar waren, sodass der Pigmentierungsgrad der Retina darauf Einfluss zu nehmen scheint. Dies sollte jedoch weiter untersucht werden, da nur drei Waldkäuze (*Strix aluco*) und eine Waldohreule (*Asio otus*) untersucht worden sind.

In der **CLSM** waren durch den Einsatz des Antikörpers Anti-Glutamin-Synthetase (Markierung der Müllerglia), des Lektins PNA (Markierung der Zapfen) und Hoechst 33258 (Darstellung der Zellkerne) sämtliche histologische Schichten differenzierbar. Das RPE wurde nicht markiert. RAUSCHER et al. (2013) setzte die immunhistochemische Färbung mit den genannten Antikörpern bereits bei einem Mäusebussard erfolgreich um. In der vorliegenden Studie wurde die Markierung für weitere tag- und nachaktive Vertreter angepasst und erfolgreich an einer Vielzahl von Individuen verschiedener Arten durchgeführt. Insgesamt waren jedoch nur sechs Vogelarten vertreten, sodass es zukünftigen Studien obliegt, ob das etablierte Protokoll auf weitere Arten, wie beispielsweise Psittaziden, übernommen werden kann. Aufgrund des sehr einheitlichen Aufbaus der retinalen Schichten sollte eine Übertragung auf andere Vogelordnungen problemlos erfolgen können und lediglich eine Anpassung des Verdünnungsfaktors für die verwendeten Antikörper notwendig sein, aufgrund von Abweichungen in der Anzahl und Verteilung von Zellstrukturen.

Die Müllergliazellen und deren Axone waren durch alle Schichten hinweg sehr gut nachverfolgbar. Die Färbung der Zellkerne wirkte sehr dicht und flächig, verursacht durch eine sehr hohe Anzahl in den Schichten. Genaue Veränderungen in der Anzahl von Zellkernen festzustellen, ist auf diese Weise somit nicht möglich. Selbst das Scannen durch einen Schnitt mithilfe eines 3D-Stapels ließ keine Differenzierung einzelner Zellkerne zu. BLANKS und JOHNSON (1984) zeigten beim Einsatz von PNA bei Hühnerretinae (*Gallus gallus*), dass PNA innerhalb der Photorezeptorenschicht nur spezifisch von Zapfen gebunden wird und nicht von Stäbchen. Dies konnte für alle in der Studie verwendeten Vogelspezies bestätigt werden. Die Markierung mit PNA führte oftmals zu vier unterschiedlich stark fluoreszierenden Banden innerhalb der Zapfenschicht: Eine sehr stark fluoreszierende Ebene direkt unterhalb der ELM, gefolgt von einer weniger stark fluoreszierenden dickeren Bande und einer stark fluoreszierenden Grenze, welche dann in leicht grün leuchtende Ausläufer (OS) zum RPE überging. Dieses Bild ist auch aus der Studie von RAUSCHER et al. (2013) bei einem Mäusebussard (*Buteo buteo*) zu entnehmen. Es ist jedoch wichtig zu erwähnen, dass sich die Darstellung der Zapfen in der vorliegenden Studie sehr variabel darstellte. Es traten Unterschiede zwischen aber auch

innerhalb derselben Art auf. Gründe hierfür könnte eine unterschiedliche Anzahl von Zapfen und ein abweichendes Stäbchen zu Zapfenverhältnis sein. Umwelteinflüsse und das Alter der Tiere könnte eine Variation innerhalb einer Art erklären. Es könnte sich aber auch um Histologische Artefakte handeln. Es wird deutlich, dass hierzu weitere Studien notwendig sind. Eine zusätzliche Markierung der Stäbchen wäre hilfreich, die in der vorliegenden Studie nicht durchgeführt worden ist, da eine Darstellung der Schichten und nicht die Untersuchung einzelner Zellstrukturen im Vordergrund stand. PNA wurde neben der Zapfenschicht stark innerhalb der IPL gebunden und war, entgegen den Beschreibungen von BLANKS und JOHNSON (1984) beim Huhn (*Gallus gallus*), bei den tagaktiven Greifvögeln nur vereinzelt in der NFL und der OPL vorzufinden. Eine sehr starke Bindung an die Axone der NFL und der OPL war jedoch bei den Eulen auffällig. Leider wurden in der Studie nur pathologisch veränderte Retinae von drei Waldkäuzen (*Strix aluco*) und eine physiologische Retina einer Waldohreule (*Asio otus*) immunhistochemisch untersucht. Mögliche Ursachen für die abweichende Bindung von PNA bei den nachtaktiven Vögeln sind in weiteren Studien zu untersuchen. Das retinale Pigmentepithel war meist von der Zapfenschicht gelöst, weshalb die Ausläufer des OS sich unterschiedlich lang innerhalb eines Schnittes darstellten und keine Aussagen zum Verhältnis IS zu OS möglich waren. Aufgrund der histologischen Prozedur war ebenso eine Ablösung der Choroidea häufig.

5.2.2 Validierung der OCT mittels CLSM

Die vorliegende Studie beschreibt zum ersten Mal einen quantitativen Punkt-zu-Punkt Vergleich zwischen der OCT und einem Goldstandard (CLSM) bei der Vogelretina. Verhältnisse zwischen der Histologie und der OCT in der aviären Augenheilkunde finden sich vereinzelt in Studien von Y. HUANG et al. (1998), RAUSCHER et al. (2013), MCKIBBIN et al. (2014), MOAYED et al. (2011) und WISELY et al. (2017). RAUSCHER et al. (2013) untersuchte die Retina eines Mäusebussards (*Buteo buteo*), alle anderen die Retina bei Haushühnern (*Gallus gallus domesticus*). In den Aufnahmen der Studien wird bereits ersichtlich, dass die Dimensionen zwischen der OCT und der Histologie nicht exakt übereinstimmen. Vergleichende Messungen lassen sich nur bei VELASCO GALLEGOS (2015) für die Gesamtdicke der Retina (ILM bis RPE) bei zwei Mäusebussarden (*Buteo buteo*) und zwei Waldkäuzen (*Strix aluco*) finden. In der vorliegenden Arbeit konnten an 30 Augen von vier verschiedenen Vogelarten, insgesamt 319 Messungen mittels der OCT und der CLSM durchgeführt und verglichen werden. Dabei ergaben die Werte für die Tiefe der Foveae die größte

Streuung und die geringste Übereinstimmung. Dies kann dadurch erklärt werden, dass bei beiden Methoden nicht garantiert werden konnte, die Fovea im selben Winkel und im tiefsten Punkt für eine Vermessung zu treffen. Dies zeigt auch die geringe Reproduzierbarkeit für die Tiefe der Foveae innerhalb der OCT auf. Werte für die Tiefe der Foveae eignen sich somit nicht für eine Validierung des OCTs. Es sollte jedoch bei allen zukünftigen Untersuchungen der Tiefe der Foveae mittels der OCT aus den genannten Gründen mit einer starken Abweichung vom wahren Wert gerechnet werden. Wieso Schicht 1 (ILM + GCL + NFL) im Gegensatz zu allen anderen Schichten in der CLSM deutlich größer als in der OCT ist, könnte daran liegen, dass die ILM und die GCL in der OCT nicht genau differenzierbar sind. Beide Schichten aber sehr deutlich in der CLSM zu sehen sind und eine genauere Vermessung stattfinden kann. Möglich wäre auch, dass wie bereits von ABBOTT et al. (2009) beschrieben, die Schichten weniger stark von einer Schrumpfung betroffen sind. Grundsätzlich kann ausgesagt werden, dass die Übereinstimmung zwischen OCT und CLSM größer war, desto höher die Werte für die einzelnen Schichten lagen. Womöglich führen dünnerne Strukturen in Kombination mit einer nicht ausreichenden Auflösung des OCTs zu diesem Ergebnis, was ebenso die Tatsache erklärt, dass eine höhere Übereinstimmung vorlag, je mehr Schichten zusammen vermessen worden sind (Schicht 3, Gesamtdicke). Es ist zu beachten, dass die OCT und die CLSM zwei grundlegend verschiedene Techniken zur Visualisierung von Zellstrukturen nutzen. Die optischen Eigenschaften, die in der OCT sichtbar werden, stimmen nicht mit den zellulären Strukturen überein, die wir in der CLSM sehen. Die Interpretation der OCT ist nach wie vor umstritten, da die optischen Eigenschaften der Zellstrukturen weitestgehend unbekannt und weitere Studien notwendig sind, um einen Zusammenhang zu beschreiben (TOTH et al., 1997; RICHARD F. SPAIDE, 2012; RAUSCHER et al., 2013). Durch die nicht einheitliche Definition der Zapfenschicht innerhalb der OCT und den zahlreichen histologischen Artefakten, denen diese Schicht in der Histologie unterliegt (Ablösungen vom RPE und dadurch Verzerrung des OS), war eine mangelnde Übereinstimmung insbesondere für diese Schicht zu erwarten. Die Ursachen für eine insgesamt mangelnde Übereinstimmung der OCT mit der CLSM, sind ebenso auf der Seite der Histologie zu suchen. Denn obwohl die Histologie als Goldstandard gilt, ist sie mit einigen Nachteilen verbunden. Jeder Schritt führt unweigerlich zu Artefakten, wie die Schrumpfung des Gewebes, Ablösungen, Verzerrungen und Zerreißungen, die die erhaltenen Werte verfälschen (WERTHER et al., 2011). Dies begründet auch die geringe Reproduzierbarkeit der Histologie in der Studie von BERGER et al. (2014). Trotz der angewandten

Punkt-zu-Punkt-Methode in der vorliegenden Studie und der Orientierung anhand der Fovea kann es sich nur um eine ähnliche Lokalisation bei der Vermessung handeln. Eine Schrumpfung in der Histologie, ungenaue Messungen in der OCT, aufgrund der Annahme eines Gullstrand-Auges, sind Beispiele, die zu einer nicht korrekten Relokalisation des Messpunktes in beiden Aufnahmen führen. Die Orientierung an der aviären Retina ist aufgrund der fehlenden Gefäße schwierig und liefert nur wenige nicht ausreichende Orientierungspunkte (VELASCO GALLEGOS, 2015). Diskrepanzen aufgrund einer geringgradigen Abweichung der Lokalisation, können somit nicht ausgeschlossen werden. Besonders in Foveanähe führen kleine Lokalisationsabweichungen zu deutlichen Dickenveränderungen. In einer aktuellen, vergleichbaren Studie von XIE et al. (2018) bei Schweineaugen lag entgegen der vorliegenden Studie eine sehr gute Übereinstimmung der Messwerte des OCTs mit der Histologie vor. Die OCT-Untersuchung fand allerdings an ex-vivo Augen statt und porcine Augen sind dem menschlichen Auge weitaus ähnlicher als das der Vögel.

5.2.3 Pathologische Befunde und Folgeuntersuchungen in der OCT

Eine Reihe von pathologischen Abweichungen der Greifvogelretina in der OCT sind in den Studien von RAUSCHER et al. (2013) und AZMANIS et al. (2015) dargestellt. Pigmentflecken, wie sie in den genannten Studien beschrieben werden, waren ebenso in der vorliegenden Untersuchung präsent. Die Beobachtungen, dass bei den betroffenen Patienten klinisch weder eine Visuseinschränkung noch eine Veränderung der Retina im Längsschnitt vorlag, konnten bestätigt werden. Mögliche Ursachen, die zu diesem Erscheinungsbild führen, wie zum Beispiel das Alter, eine übermäßige Lichtexposition (bei Eulen), oder parasitär und entzündungsbedingte Narbenbildungen, müssen in weiteren Studien untersucht werden. Mit der vorliegenden Studie kann hierzu ausgesagt werden, dass dieses Phänomen nicht speziesabhängig ist, da die Pigmentflecken beim Mäusebussard (*Buteo buteo*), Sperber (*Accipiter nisus*), Habicht (*Accipiter gentilis*) und auch beim Turmfalken (*Falco tinnunculus*) beobachtet werden konnten. Bei einem Patienten war das ungefähre Alter bekannt. Ein circa 20-jähriger Mäusebussard (*Buteo buteo*) wies ebenso eine Pigmentvariation auf, jedoch stellte sich diese diffus flächig dar und zeigte nicht die beschriebenen rundlichen Flecken. So könnte es sein, dass diese Erscheinung nicht mit einem erhöhten Alter korreliert. Dies kann aber nicht sicher ausgesagt werden, da nur bei diesem einem Patienten das Alter bekannt war. Es bestand keine Korrelation zum Pigmentstatus des Gefieders des Patienten. Einflüsse des Pigmentierungsgrades des Vogels auf den Fundus (z. B. bei der

hyperpigmentierten Cemani Hühnerrasse) sind in weiteren Studien zu untersuchen. Besonders auffällig war, dass sogenannte drusenartige Veränderungen in der vorliegenden Studie vornehmlich bei Eulen vorkamen. Die Darstellung in der Fundusaufsicht und im B-Scan des OCTs variierte und der Visus war in unterschiedlichem Ausmaß eingeschränkt. Die Veränderungen wurden in der indirekten Ophthalmoskopie zum Teil als Chorioretinitis diagnostiziert. Beim Menschen spielen sogenannte Drusen und Pseudodrusen bei der altersbedingten Makuladegeneration eine Rolle (HOLZ et al., 2011; YOSHIMURA und HANGAI, 2014). Mit zunehmendem Alter nimmt die Häufigkeit der Drusen beim Menschen zu. Einen Einfluss auf die Sehkraft scheinen sie nicht zu haben. Ob das Alter bei Vögeln für diese Veränderungen ebenfalls von Bedeutung ist, kann mit der vorliegenden Studie nicht ausgesagt werden. Dagegen spricht jedoch, dass Vögel in Bezug auf andere Organsysteme nur sehr wenige bis gar keine (z. B. Gefiederpigmentierung) Alterserscheinungen zeigen. Welche Ursachen zugrunde liegen und der Einfluss auf den Visus müssen weiter untersucht werden.

Weder RAUSCHER et al. (2013) noch AZMANIS et al. (2015) dokumentieren Retinaläsionen im zeitlichen Verlauf, sodass dies erstmalig mit der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde. Die OCT erwies sich als ideales Hilfsmittel, um pathologische Prozesse über einen längeren Zeitraum hinweg zu überwachen und bessere Aussagen für eine Prognose treffen zu können. Zukünftig wäre es denkbar auf diesem Weg Therapien und Krankheitsverläufe zu überwachen und zu beobachten. Auch neue Therapieansätze ließen sich auf diese Weise überprüfen. Die OCT liefert keine detaillierten Informationen zu individuellen Zellen (CEBULLA et al., 2010). So können beispielsweise in den Folgeuntersuchungen im Längsschnitt oftmals migrierte Zellen beobachtet werden, eine Aussage um welche Zellen es sich handelt ist mit der OCT jedoch nicht möglich. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um migrierte Zellen des Pigmentepithels (CLEARY und RYAN, 1979; MÜLLER, 2010). Histologische Studien sind zum Verständnis verschiedener Läsionen weiterhin dringend notwendig. Sie ermöglichen zudem eine bessere Beurteilung zur Bedeutung einzelner Veränderungen für den Visus. Einerseits kann die OCT als diagnostisches Werkzeug bei pathologischen Veränderungen sehr nützlich sein und detektiert Abweichungen sicherer als die direkte und indirekte Ophthalmoskopie (RUGGERI et al., 2010; RAUSCHER et al., 2013; VELASCO GALLEGOS, 2015), andererseits sind dem Verfahren schnell Grenzen gesetzt. Zustände wie ein Hyphäma (Einblutung in die vordere Augenkammer),

Einblutungen und Entzündungsprodukte in die hintere Augenkammer, Trübungen der Linse oder ein Nystagmus (abnorme und unkontrollierbare Bewegungen des Auges) führten zur Unbrauchbarkeit der OCT. In solchen Fällen ist es notwendig andere diagnostische Methoden, wie zum Beispiel die Sonographie (LIEPERT, 2013), zu verwenden, um Aussagen über den Zustand der Retina treffen zu können. Die Studie unterstreicht die Aussage, dass die OCT als alleiniges diagnostisches Mittel nicht ausreicht. Es sind stets weitere Untersuchungen (Visuskontrolle, Ophthalmoskopie) durchzuführen und für eine Prognose sowie Therapie in Betracht zu ziehen.

5.2.4 Interpretation pathologischer Befunde in der CLSM

Erste Beschreibungen zum Verhalten der aviären Retinaschichten bei pathologischen Vorgängen sind von MÜLLER (2010) bei Taubenaugen mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Richardson gefärbten Schnitten zu finden. MÜLLER (2010) geht vor allem auf Veränderungen des RPEs und der Photorezeptorenschicht ein. In der vorliegenden Studie war es durch die durchgeführte Immunhistochemie möglich das Verhalten der Müllergliazellen zu untersuchen. Hierfür ist es notwendig Kenntnisse über die Funktion der Müllergliazelle zu verfügen. Sie besitzt neben ihrer Halte- und Stützfunktion der Retina eine wichtige Rolle bei pathologischen Prozessen. Jeder pathologische Stimulus führt zu einer Aktivierung der Müllergliazellen (BRINGMANN und WIEDEMANN, 2012). Über die zellulären Mechanismen ist allerdings nur wenig bekannt. Man spricht bei pathologischen Vorgängen von einer sogenannten „Dreifach-Gliareaktion“, welche aus einer Hypertrophie, Proliferation und Migration besteht (TACKENBERG et al., 2009). Nach einer Ablösung der Retina und Zerstörung der Photorezeptoren kommt es sehr schnell zu einer Hypertrophie der Müllergliazellen, welche die entstandenen Lücken füllen (LEWIS und FISHER, 2000; LIU et al., 2018). FISHER et al. (1991) beschreibt, dass eine Hypertrophie bereits nach einem Tag der Retinaablösung eintritt. Nach zwei Tagen ist dieser Vorgang innerhalb der Retina und im subretinalen Raum sichtbar (LEWIS et al., 1995). Die durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen in der vorliegenden Studie bestätigen, dass diese pathologischen Prozesse auch bei Vögeln sicher eintreten. Es ist in allen Fällen eine Hypertrophie und Proliferation der Müllergliazellen zu sehen. Die Ausläufer verlängern sich und gehen über die ELM hinaus. Zum Teil ist ebenso eine Migration der Müllergliazellen in den subretinalen Raum sichtbar. Welche Stimuli hierzu führen ist unbekannt. LEWIS und FISHER (2000) gehen davon aus, dass womöglich die Zapfenzellen bestimmte Faktoren produzieren, da die

hypertrophierten Müllerglia im subretinalen Raum stets den Zapfen benachbart liegen. Von einer Retinaablösung scheinen vor allem die Zapfen und nicht die Stäbchen betroffen zu sein, da jeglicher Versuch überlebende Zapfen immunhistochemisch zu markieren nicht gelingt, die Stäbchen jedoch weiterhin markiert werden können (ANDERSON et al., 1986; REX et al., 2002). In der vorliegenden Studie war an den Stellen einer Ablösung ebenfalls nur vereinzelt bis gar keine Markierung von Zapfenzellen möglich. PNA markiert nur die Hülle der Zapfenzellen, sodass für eine sichere Aussage weitere Marker verwendet werden müssen. Über das Verhalten der Stäbchen kann in der vorliegenden Studie keine Beschreibung erfolgen, da keine Markierung durchgeführt wurde. Die Tatsache, dass die Zapfenzellen stärker bei einer Retinaablösung betroffen sind, könnte erklären wieso die Eulen in der vorliegenden Studie, deren Retina hauptsächlich Stäbchen aufweist, trotz großflächiger Retinaalterationen klinisch eine gute Orientierung und Flugvermögen zeigten. Die Kompensation des eingeschränkten Visus durch den Gehörsinn ist bei diesen Vögeln jedoch ebenso von Bedeutung. Da die Müllergliazelle die einzige Gliazellart der aviären Retina darstellt, wäre die Vogelretina ein ideales Modell um die pathophysiologischen Prozesse in weiteren Studien genauer zu untersuchen. Die Glutamin-Synthetase, wie sie in der vorliegenden Studie markiert wurde, stellt keinen Indikator für die Aktivierung der Zelle dar (TACKENBERG et al., 2009). Für ein besseres Verständnis der auftretenden Mechanismen und zellulären Antworten ist es somit notwendig mehrere Marker zu verwenden. Im direkten Vergleich der pathologischen Veränderungen im OCT mit der CLSM wird sichtbar, dass sich die Alterationen in der Histologie ausgeprägter darstellen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die histologische Verarbeitung dazu führt, dass leichte Ablösungen weiter auseinanderweichen und hochgradiger erscheinen.

5.3 Schlussbeurteilung

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen konnte erstmals eine quantitative Punkt-zu-Punkt Validierung der OCT durchgeführt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass bei größtmöglicher Schonung und vergleichsweise geringem Einsatz von Fixationstechniken, reproduzierbare und qualitativ ausreichende OCT-Ergebnisse erzielt werden können. Die sichtbaren Veränderungen und Trends innerhalb der OCT-Aufnahme stimmen mit der Histologie überein, sodass die OCT ein sicheres diagnostisches Mittel zur Detektion und Überwachung pathologischer Abweichungen, sowie deren Verlauf darstellt. Das Untersuchungsverfahren bietet sich daher als schonende, mit geringer Belastung verbundene Methode nicht nur für die Diagnostik sondern auch für

experimentelle Fragestellungen an, wie z. B. zur Untersuchung von Infektionserkrankungen und ihre okularen Manifestationen im zeitlichen Verlauf (z. B. bei West Nile oder Borna - Virusinfektionen). Besonders die West-Nil-Virus Infektion ist aktuell von großen Interesse durch die sich häufenden Fälle in Europa und auch in Vergangenheit schon Bestandteil vieler Untersuchungen zur okularen Manifestation (YAHIA und KHAIRALLAH, 2009; MALHOTRA et al., 2014). Weitere Untersuchungsfelder könnten Auswirkungen von verschiedenen (Low-light) Lichtprogrammen und deren tierschutzrechtlich relevanten Folgen im Sinne eines LIAG (light-induced avian glaucoma mit lichtinduzierter Degeneration/Atrophie verschiedener okularer Schichten) darstellen. Diese Fragestellung ist aus tierschutz- und haltungstechnischer Sicht von sehr großem Interesse und Aktualität (BLATCHFORD et al., 2009; NICKLA und TOTONELLY, 2016; RAULT et al., 2017)

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die optische Kohärenztomographie (OCT) erweist sich in der Humanophthalmologie als unverzichtbares Werkzeug zur Diagnostik von Augenerkrankungen und gilt hier als Goldstandard zur Erkennung von Retinopathien. Der Einsatz der OCT erfährt in den letzten Jahren auch immer mehr Zuspruch in der Tiermedizin. Gerade bei Vögeln, bei denen das Auge das wichtigste Sinnesorgan darstellt, ist der Einsatz dieser Technik von großem diagnostischem und experimentellem Interesse.

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Validierung von OCT-Aufnahmen der Retina in der aviären Augenheilkunde. Hierfür wurde erstmals eine Punkt-zu-Punkt-Vermessung und -Vergleich der OCT mit der Histologie durchgeführt.

Dabei gingen 50 Augen von 27 Greifvögeln in die OCT-Untersuchung ein. Bei den Patienten handelte es sich um wildlebende Greifvögel, welche von November 2017 bis Dezember 2018 in eine Vogelklinik eingeliefert worden sind. Die OCT-Aufnahmen wurden mit einem SPECTRALIS® HRA+OCT (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany) aufgenommen und mit der Software Heidelberg Eye Explorer 1.10.2.0. vermessen. Die Tiere wurden aufgrund infauster Prognose aus tierschutzrechtlichen Gründen anschließend euthanasiert und die Augen für eine histologische Untersuchung entnommen. Für die histologische Untersuchung wurde die Retina immunhistochemisch markiert und mit einem OLYMPUS BX51WI Mikroskop mit einer OLYMPUS BX-DSU (Olympus; Tokio, Japan) konfokalmikroskopisch dokumentiert. Die Aufnahmen wurden mit der Stereo Investigator Software 11.02.01 (MBF Science, Williston, USA) ausgewertet.

Sowohl in der OCT als auch in der konfokalmikroskopischen Aufnahme wurden die Tiefe der Foveae vermessen und die Schichtdicken der Internal Limiting Membrane + Nerve Fiber Layer + Ganglion Cell Layer, die Inner Plexiform Layer, die Inner Nuclear Layer + Outer Plexiform Layer + Outer Nuclear Layer + External Limiting Membrane, das Inner Segment der Zapfenschicht sowie die Gesamtdicke der Retina (Internal Limiting Membrane bis Inner Segment). Dabei fungierte die Fovea centralis als Orientierungspunkt in beiden Aufnahmen. Die OCT-Untersuchung fand am wachen Patienten statt, ohne eine Sedierung. In Einzelfällen wurde eine Schmerzmedikation mit Butorphanol (4mg/kg KM) durchgeführt. Um die Reproduzierbarkeit der OCT zu bestimmen, wurden zwei Aufnahmen vermessen. Dabei ergab sich für die OCT eine hervorragende

Reproduzierbarkeit (Gesamtdicke der Retina 1,3 %). Für den Vergleich der OCT mit der Histologie konnten insgesamt 319 Messungen von 30 gesunden Augen von vier verschiedenen Vogelspezies eingehen. Der Vergleich ergab eine geringe Übereinstimmung beider Methoden. Der Hauptgrund hierfür ist in der grundlegend abweichenden Technik beider Verfahren zu suchen.

Die OCT stellt die optischen Eigenschaften zellulärer Strukturen dar, wohingegen die Immunhistochemie einzeln markierte Zellen visualisiert. Der Zusammenhang zwischen individuellen zellulären Strukturen und ihren optischen Eigenschaften ist weitestgehend unbekannt und weitere Studien hierzu notwendig. Das Vogelauge weist zudem zahlreiche Besonderheiten im Vergleich zum menschlichen Auge auf. Trotz der geringen Übereinstimmung der Werte mit der Histologie, stimmten die sichtbaren Veränderungen und Trends in der OCT mit der Histologie überein. Die OCT ermöglicht eine sichere und verlässliche Methode, um pathologische Abweichungen zu detektieren. In der vorliegenden Studie wurden erstmals Läsionen im zeitlichen Verlauf bei drei Waldkäuzen (*Strix aluco*) und einem Mäusebussard (*Buteo buteo*) dargestellt und der Nutzen der OCT zur Überwachung und Untersuchung von Retinaalterationen dargestellt.

Aufgrund der Ergebnisse ist die optische Kohärenztomographie als ein wichtiges diagnostisches Mittel in der aviären Augenheilkunde anzusehen. Es ermöglicht Abweichungen sicher zu detektieren und diese im zeitlichen Verlauf zu dokumentieren, pathologische Prozesse zu verstehen und Prognosen besser zu evaluieren. Es ist dringend notwendig in zukünftigen Studien weitere pathologische Abweichungen in der OCT zu beschreiben, vor allem im Zusammenhang mit der Bedeutung für den Visus. Zukünftig sollten weitere Veränderungen mit der Histologie abgeglichen werden, um die zellulären Mechanismen besser zu verstehen und somit auch die Bedeutung für die Sehkraft. Die Studie liefert hierfür ein Basisprotokoll zur immunhistochemischen Markierung der aviären Retina bei tag- und nachaktiven Vögeln. In künftigen Studien sollte die OCT ebenso Einsatz zur Untersuchung von Infektionserkrankungen und ihre okularen Manifestationen im zeitlichen Verlauf (z.B. West-Nile-Virus oder Bornavirus) finden und könnte ebenso bei der Fragestellung eines lichtinduziertes Glaukoms Anwendung finden.

VII. SUMMARY

Optical coherence tomography (OCT) has proven to be an indispensable tool in human ophthalmology for the diagnosis of eye diseases and is regarded as the gold standard for the detection of retinopathies. In recent years, the use of OCT gained increasing popularity in veterinary medicine. Especially in birds, where the eye is the most important sensory organ, the use of this technique is of great diagnostic and experimental interest.

The aim of the study was to validate OCT images of the retina in avian ophthalmology. To achieve this, a point-to-point measurement and comparison of OCT with histology was performed for the first time.

50 eyes of 27 birds of prey were included in the OCT examination. The patients were wild birds of prey who were admitted to an avian clinic from November 2017 to December 2018. The OCT images were taken with a SPECTRALIS® HRA+OCT (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany) and measured with the Heidelberg Eye Explorer 1.10.2.0 software. The animals were euthanized due to an infaust prognosis and for reasons of animal welfare. In those cases the eyes were removed for histological examination. For histological examination, the retina was immunohistochemically labelled and confocally imaged with an OLYMPUS BX51WI microscope and an OLYMPUS BX-DSU (Olympus; Tokyo, Japan) confocal microscope. The images were evaluated with the Stereo Investigator Software 11.02.01 (MBF Science, Williston, USA).

In both OCT and confocal microscopy, the depth of the foveae and the layer thicknesses of the Internal Limiting Membrane + Nerve Fiber Layer + Ganglion Cell Layer, the Inner Plexiform Layer, the Inner Nuclear Layer + Outer Plexiform Layer + Outer Nuclear Layer + External Limiting Membrane, the Inner Segment of the cone layer as well as the total thickness of the retina (Internal Limiting Membrane to Inner Segment) were measured. The fovea centralis served as an orientation point in both images. The OCT examination was performed on the awake patient without sedation. In individual cases, pain medication with butorphanol (4mg/kg KM) was administered. To determine the reproducibility of the OCT, two images were measured, resulting in excellent reproducibility for OCT (total retinal thickness 1.3%). To compare OCT with histology, a total of 319 measurements from 30 healthy eyes of four different bird species were obtained. The comparison showed a low agreement between the two methods. The main reason causing this poor agreement is the fundamentally different technique of

both methods.

OCT represents the optical properties of cellular structures, whereas immunohistochemistry visualizes individually labelled cells. The relationship between individual cellular structures and their optical properties is largely unknown and further studies are necessary. The birds eye also has numerous special features compared to the human eye. Despite the low agreement of the values achieved by OCT and histology, the visible changes and trends in OCT were reliable and corresponded with histological findings. OCT provides a safe and reliable method to detect pathological abnormalities. This study was the first to show a follow up examination in three forest owls (*Strix aluco*) and one buzzard (*Buteo buteo*) that demonstrated the benefits of OCT for monitoring and investigating retinal alterations.

Based on the results, optical coherence tomography is an important diagnostic tool in avian ophthalmology. It enables the reliable detection of abnormalities, an improved understanding of pathological processes and their trends over a period, as well as a better evaluation of prognoses. It is necessary to describe further pathological alterations visible in OCT in future studies, especially their impact and importance for visual acuity. In the future, more abnormalities should be compared with histology in order to understand ultrastructural mechanisms and their relevance for vision. For this purpose, the study provides a basic protocol for the immunohistochemical labelling of the avian retina in diurnal and nocturnal birds. Future studies should also include OCT-investigations of infectious diseases and their ocular manifestations (e.g. West-Nile-Virus or Bornavirus). Cases of light-induced glaucoma as a relevant animal welfare subject could also be investigated by OCT in further studies.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 ABBOTT, C. J., MCBRIEN, N. A., GRÜNERT, U., PIANTA, M. J. (2009): Relationship of the Optical Coherence Tomography Signal to Underlying Retinal Histology in the Tree Shrew (*Tupaia belangeri*). *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50, 1, 414-423.
- 2 ABDELKADER, A., ELEWAH, E.-S. M., KAUFMAN, H. E. (2010): Confocal microscopy of corneal wound healing after deep lamellar keratoplasty in rabbits. *Archives of Ophthalmology* 128, 1, 75-80.
- 3 AL-MUJAINI, A., WALI, U. K., AZEEM, S. (2013): Optical Coherence Tomography: Clinical Applications in Medical Practice. *Oman Medical Journal* 28, 2, 86-91.
- 4 ALARIO, A. F., PIRIE, C. G. (2013): Intra and inter-user reliability of central corneal thickness measurements obtained in healthy feline eyes using a portable spectral-domain optical coherence tomography device. *Veterinary Ophthalmology* 16, 6, 446-450.
- 5 ALARIO, A. F., PIRIE, C. G. (2014): Reliability of manual measurements of corneal thickness obtained from healthy canine eyes using spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT). *Canadian Journal of Veterinary Research* 78, 3, 221-225.
- 6 ALSHEHRI, J. M., CABALLERO-LIMA, D., HILLARBY, M. C., SHAWCROSS, S. G., BRAHMA, A., CARLEY, F., READ, N. D., RADHAKRISHNAN, H. (2016): Evaluation of Corneal Cross-Linking for Treatment of Fungal Keratitis: Using Confocal Laser Scanning Microscopy on an Ex Vivo Human Corneal Model. *Investigative ophthalmology & visual science* 57, 14, 6367-6373.
- 7 ALTMAN, D. G., BLAND, J. M. (1983): Measurement in Medicine: The Analysis of Method Comparison Studies. *Journal of the Royal Statistical Society: Series D (The Statistician)* 32, 3, 307-317.
- 8 ANDERSON, D. H., GUERIN, C. J., ERICKSON, P. A., STERN, W. H., FISHER, S. K. (1986): Morphological recovery in the reattached retina. *Investigative ophthalmology & visual science* 27, 2, 168-183.
- 9 AZMANIS, P., KOCH, C., FRANKE, M., RAUSCHER, F. G., HÜBEL, J., THIELEBEIN, J., KRAUTWALD-JUNGHANNS, M. E. (2012): Der Einsatz der optischen Kohärenztomographie (OCT) als diagnostisches Verfahren in der Ornitho-Ophthalmologie. *Proceedings 17. DVG Tagung über Vogelkrankheiten*, 38-41.
- 10 AZMANIS, P., RAUSCHER, F. G., WERNER, B., HÜBEL, J., KOCH, C.

- (2015): The Additional Diagnostic Value of Optical Coherence Tomography (OCT) and Its Application Procedure in A Wide Variety of Avian Species. *Journal of Clinical and Experimental Ophthalmology* 6, 431, 2.
- 11 BACSICH, P., GELLÉRT, A. (1935): Beiträge zur Kenntnis der Struktur und Funktion des Pectens im Vogelauge. *Albrecht von Graefes Archiv für Ophthalmologie* 133, 3, 448-460.
- 12 BARLOW, H. B., OSTWALD, T. J. (1972): Pecten of the pigeon's eye as an inter-ocular eye shade. *Nature New Biology* 236, 64, 88-90.
- 13 BAUMAL, C. R. (1999): Clinical applications of optical coherence tomography. *Current opinion in ophthalmology* 10, 3, 182-188.
- 14 BAUMANN, B., SCHIRMER, J., RAUSCHER, S., FIALOVA, S., GLOSMANN, M., AUGUSTIN, M., PIRCHER, M., GROGER, M., HITZENBERGER, C. K. (2015): Melanin Pigmentation in Rat Eyes: In Vivo Imaging by Polarization-Sensitive Optical Coherence Tomography and Comparison to Histology. *Investigative ophthalmology & visual science* 56, 12, 7462-7472.
- 15 BAWA, S. R., YASHROY, R. C. (1974): Structure and function of vulture pecten. *Cells Tissues Organs* 89, 3, 473-480.
- 16 BEMIS, A. M., PIRIE, C. G., LOPINTO, A. J., MARANDA, L. (2017): Reproducibility and repeatability of optical coherence tomography imaging of the optic nerve head in normal beagle eyes. *Veterinary Ophthalmology* 20, 6, 480-487.
- 17 BERGER, A., CAVALLERO, S., DOMINGUEZ, E., BARBE, P., SIMONUTTI, M., SAHEL, J. A., SENNLAUB, F., RAOUL, W., PAQUES, M., BEMELMANS, A. P. (2014): Spectral-domain optical coherence tomography of the rodent eye: highlighting layers of the outer retina using signal averaging and comparison with histology. *PLoS One* 9, 5, e96494.
- 18 BLANKS, J. C., JOHNSON, L. V. (1984): Specific binding of peanut lectin to a class of retinal photoreceptor cells. A species comparison. *Investigative ophthalmology & visual science* 25, 5, 546-557.
- 19 BLATCHFORD, R. A., KLASING, K. C., SHIVAPRASAD, H. L., WAKENELL, P. S., ARCHER, G. S., MENCH, J. A. (2009): The effect of light intensity on the behavior, eye and leg health, and immune function of broiler chickens. *Poult Sci* 88, 1, 20-28.
- 20 BOCCARA, C., DUBOIS, A. (2013): Optical Coherence Tomography Optics in Instruments: Applications in Biology and Medicine (101-123). Hoboken, NJ USA. John Wiley & Sons, Inc.

- 21 BOENISCH, T. (2001): DAKO Handbook: Immunochemical Staining Methods. In D. Corporation (Ed.) (3 ed., pp. 64). Carpinteria, California: DAKO Corporation.
- 22 BOPPART, S. A. (2003): Optical coherence tomography: technology and applications for neuroimaging. *Psychophysiology* 40, 4, 529-541.
- 23 BORLINGHAUS, R. T. (2016): Konfokale Mikroskopie in Weiß: optische Schnitte in allen Farben. Berlin, Heidelberg. Springer Berlin Heidelberg.
- 24 BRAEKEVELT, C. R. (1991): Fine Structure of the Pecten Oculi of the Red-Tailed Hawk (*Buteo jamaicensis*). *Anatomia, Histologia, Embryologia* 20, 4, 354-362.
- 25 BRAEKEVELT, C. R. (1993): Fine structure of the pecten oculi in the great horned owl (*Bubo virginianus*). *Histology and histopathology* 8, 1, 9-15.
- 26 BRINGMANN, A., WIEDEMANN, P. (2012): Muller glial cells in retinal disease. *Ophthalmologica* 227, 1, 1-19.
- 27 BRUGGE, W. R. (2006): Optical Coherence Tomography: New Applications in Gastroenterology. *Gastroenterology & hepatology* 2, 4, 237-238.
- 28 BRUNO, L., MARCO, R. (2010): Guide to interpreting spectral domain optical coherence tomography. Dublin. I.N.C. Innovation-News-Communication.
- 29 BUSCH, C., KOH, S., OIE, Y., ICHII, M., KANAKURA, Y., NISHIDA, K. (2017): In vivo confocal microscopy of multiple myeloma associated crystalline keratopathy. *American Journal of Hematology* 92, 6, 593-594.
- 30 CEBULLA, C. M., RUGGERI, M., MURRAY, T. G., FEUER, W. J., HERNANDEZ, E. (2010): Spectral domain optical coherence tomography in a murine retinal detachment model. *Experimental Eye Research* 90, 4, 521-527.
- 31 CHEN, J., LEE, L. (2007): Clinical applications and new developments of optical coherence tomography: an evidence-based review. *Clinical and Experimental Optometry* 90, 5, 317-335.
- 32 CHIDLLOW, G., DAYMON, M., WOOD, J. P., CASSON, R. J. (2011): Localization of a wide-ranging panel of antigens in the rat retina by immunohistochemistry: comparison of Davidson's solution and formalin as fixatives. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 59, 10, 884-898.
- 33 CLEARY, P. E., RYAN, S. J. (1979): Experimental posterior penetrating

- eye injury in the rabbit. II. Histology of wound, vitreous, and retina. British Journal of Ophthalmology 63, 5, 312-321.
- 34 CUI, Z. C. (1989): Allowable limit of error in clinical chemistry quality control. Clinical Chemistry 35, 4, 630-631.
- 35 DAVIDSON, M. (1997): Ocular consequences of trauma in raptors. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine 6, 3, 121-130.
- 36 DEHGHANI, C., PRITCHARD, N., EDWARDS, K., RUSSELL, A. W., MALIK, R. A., EFRON, N. (2016): Abnormal Anterior Corneal Morphology in Diabetes Observed Using In Vivo Laser-scanning Confocal Microscopy. The Ocular Surface 14, 4, 507-514.
- 37 DOROBEK, K. (2013). *Dreidimensionale Sonographie am Vogelauge-das vordere Augensegment*. Unpublished Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- 38 DREXLER, W., FUJIMOTO, J. G. (2008): Optical coherence tomography: technology and applications. Berlin [u.a.]. Springer.
- 39 DUKE-ELDER, S. (1976): The Eye in Evolution System of Ophthalmology (Vol. 1). London. Henry Kimpton Publishers.
- 40 ENGELHARDT, J., KNEBEL, W. (1993): Konfokale Laserscanning-Mikroskopie. Physik in unserer Zeit 24, 2, 70-78.
- 41 FAMOSE, F. (2014): Assessment of the use of spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT) for evaluation of the healthy and pathological cornea in dogs and cats. Veterinary Ophthalmology 17, 1, 12-22.
- 42 FERCHER, A. F., DREXLER, W., HITZENBERGER, C. K., LASSER, T. (2003): Optical coherence tomography - principles and applications. Reports on Progress in Physics 66, 2, 239.
- 43 FERGUSON, L. R., GROVER, S., DOMINGUEZ, J. M., 2ND, BALAIYA, S., CHALAM, K. V. (2014): Retinal thickness measurement obtained with spectral domain optical coherence tomography assisted optical biopsy accurately correlates with ex vivo histology. PLoS One 9, 10, e111203.
- 44 FISHER, S. K., ERICKSON, P. A., LEWIS, G. P., ANDERSON, D. H. (1991): Intraretinal proliferation induced by retinal detachment. Investigative ophthalmology & visual science 32, 6, 1739-1748.
- 45 GAVRILOVA, O., ZAVIALOVA, N., TEKLEVA, M., KARASEV, E. (2018): Potential of CLSM in studying some modern and fossil

- palyнологical objects. *Journal of Microscopy* 269, 3, 291-309.
- 46 GEKELER, F., GMEINER, H., VOLKER, M., SACHS, H., MESSIAS, A., EULE, C., BARTZ-SCHMIDT, K. U., ZRENNER, E., SHINODA, K. (2007): Assessment of the posterior segment of the cat eye by optical coherence tomography (OCT). *Veterinary Ophthalmology* 10, 3, 173-178.
- 47 GIANI, A., CIGADA, M., CHOUDHRY, N., DEIRO, A. P., OLDANI, M., PELLEGRINI, M., INVERNIZZI, A., DUCA, P., MILLER, J. W., STAURENGHI, G. (2010): Reproducibility of Retinal Thickness Measurements on Normal and Pathologic Eyes by Different Optical Coherence Tomography Instruments. *American Journal of Ophthalmology* 150, 6, 815-824.e811.
- 48 GIANNAKAKI-ZIMMERMANN, H., KOKONA, D., WOLF, S., EBNETER, A., ZINKERNAGEL, M. S. (2016): Optical Coherence Tomography Angiography in Mice: Comparison with Confocal Scanning Laser Microscopy and Fluorescein Angiography. *Translational Vision Science & Technology* 5, 4, 11.
- 49 HAHNENBERGER, R. W. (1976): Influence of various anesthetic drugs on the intraocular pressure of cats. *Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie* 199, 2, 179-186.
- 50 HEES, H., SINOWATZ, F. (1992): Histologie: Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie. München. Selbstverl.
- 51 HOFF, F. (2015). How to Prepare Your Specimen for Immunofluorescence Microscopy. Retrieved from <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/how-to-prepare-your-specimen-for-immunofluorescence-microscopy/> (Stand: 10.02.2020)
- 52 HOLVE, D. L., GUM, G. G., PRITT, S. L. (2013): Effect of sedation with xylazine and ketamine on intraocular pressure in New Zealand white rabbits. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 52, 4, 488-490.
- 53 HOLZ, F., PAULEIKHOFF, D., F. SPAIDE, R., BIRD, A. (2011): Altersabhängige Makuladegeneration (3 ed.). Berlin [u.a]. Springer.
- 54 HUANG, D., SWANSON, E. A., LIN, C. P., SCHUMAN, J. S., STINSON, W. G., CHANG, W., HEE, M. R., FLOTTE, T., GREGORY, K., PULIAFITO, C. A., ET AL. (1991): Optical coherence tomography. *Science* 254, 5035, 1178-1181.
- 55 HUANG, Y., CIDECIYAN, A. V., PAPASTERGIOU, G. I., BANIN, E., SEMPLE-ROWLAND, S. L., MILAM, A. H., JACOBSON, S. G. (1998): Relation of optical coherence tomography to microanatomy in normal and rd chickens. *Investigative ophthalmology & visual science* 39, 12, 2405-

2416.

- 56 INZUNZA, O., BRAVO, H., SMITH, R., ANGEL, M. (1991): Topography and morphology of retinal ganglion cells in Falconiforms: A study on predatory and carrion-eating birds. *Anatomical Record* 229, 2, 271-277.
- 57 JONKMAN, J., BROWN, C. M. (2015): Any way you slice it—a comparison of confocal microscopy techniques. *Journal of biomolecular techniques* 26, 2, 54.
- 58 KAJIKAWA, J. (1923): Beiträge zur Anatomie und Physiologie des Vogelauges. *Albrecht von Graefes Archiv für Ophthalmologie* 112, 2, 260-346.
- 59 KHAROUSI, N. A., WALI, U. K., AZEEM, S. (2013): Current applications of optical coherence tomography in ophthalmology, *Optical Coherence Tomography* (pp. 31): IntechOpen.
- 60 KIAMA, S. G., MAINA, J. N., BHATTACHARJEE, J., WEYRAUCH, K. D., GEHR, P. (1998): A scanning electron microscope study of the luminal surface specializations in the blood vessels of the pecten oculi in a diurnal bird, the black kite (*Milvus migrans*). *Annals of Anatomy* 180, 5, 455-460.
- 61 KING, A. S., MCLELLAND, J. (1984): *Birds: Their Structure and Function* (2 ed. Vol. 2). London. Baillière Tindall.
- 62 KÖNIG, H. E., LIEBICH, H.-G. (2009): *Sehorgan (Organum visus) Anatomie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis* (567-579). Stuttgart [u.a.]. Schattauer
- 63 KORBEL, R. (1991): Zum derzeitigen Stand der Ornitho-Ophthalmologie. *Tierärztliche Praxis* 19, 497-507.
- 64 KORBEL, R. (1994). *Augenkrankheiten bei Vögeln: Ätiologie und Klinik von Augenkrankheiten, Luftsack-Perfusionsanästhesie, ophthalmologische Photographie und Bildatlas der Augenkrankheiten bei Vögeln*. Unpublished Vet Habilitation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- 65 KORBEL, R. (2002). *Avian Ophthalmology-Principles and Application*. Paper presented at the WSAVA CONGRESS.
- 66 KORBEL, R., BARWIG, S., RINDER, M. (2012): Vergleichende Untersuchungen zur Ophthalmoskopie, digitalen Scanning Ophthalmoskopie (SDO) und optischen Kohärenztomographie (OCT) unter besonderer Berücksichtigung Bornavirus-assozierter ophthalmologischer Befunde am Vogelauge. Tagungsband der 17. DVG-

- Tagung über Vogelkrankheiten, München, 1.-3. März, 43-46.
- 67 KORBEL, R., REDIG, P., JONES, R. (1999): Untersuchungen zur Fluoreszenzangiographie am Greifvogelauge. Tierärztliche Praxis 27, 396-407.
- 68 KUMAR, L. R. (2017): Comment on: 'Corneal confocal scanning laser microscopy in patients with dry eye disease treated with topical cyclosporine'. Eye 32, 4, 835.
- 69 KUNERT, K. S., FITZGERALD, M. E. C., THOMSON, L., DOREY, C. K. (1999): Microglia increase as photoreceptors decrease in the aging avian retina. Current Eye Research 18, 6, 440-447.
- 70 LANG, G. (2013): Histotechnik: Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik (2 ed.). Wien [u.a.]. Springer.
- 71 LATENDRESSE, J. R., WARBRITTION, A. R., JONASSEN, H., CREASY, D. M. (2002): Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's Fluid. Toxicologic Pathology 30, 4, 524-533.
- 72 LEWIS, G. P., FISHER, S. K. (2000): Muller cell outgrowth after retinal detachment: association with cone photoreceptors. Investigative ophthalmology & visual science 41, 6, 1542-1545.
- 73 LEWIS, G. P., MATSUMOTO, B., FISHER, S. K. (1995): Changes in the organization and expression of cytoskeletal proteins during retinal degeneration induced by retinal detachment. Investigative ophthalmology & visual science 36, 12, 2404-2416.
- 74 LIEPERT, A. (2013). *Dreidimensionale Sonographie am gesunden und erkrankten Vogelauge*. Unpublished Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- 75 LISNEY, T. J., IWANIUK, A. N., BANDET, M. V., WYLIE, D. R. (2012): Eye Shape and Retinal Topography in Owls (Aves: Strigiformes). Brain, Behavior and Evolution 79, 4, 218-236.
- 76 LIU, S., CHEN, Y., CHEN, Z., XING, Y., SHEN, Y. (2018): Immunohistochemical profile of long-standing traumatic retinal detachment in atrophic globe in a young patient. Experimental and therapeutic medicine 16, 3, 2387-2391.
- 77 LOPINTO, A. J., PIRIE, C. G., BEDENICE, D., AYRES, S. L. (2017): Corneal thickness of eyes of healthy goats, sheep, and alpacas manually measured by use of a portable spectral-domain optical coherence tomography device. American journal of veterinary research 78, 1, 80-84.

- 78 MALHOTRA, K., RAMANATHAN, R. S., SYNOWIEC, A., RANA, S. (2014): Rare ocular manifestation in a case of West Nile virus meningoencephalitis. *Annals of Indian Academy of Neurology* 17, 1, 95-96.
- 79 MANN, I. C. (1924): The function of the pecten. *The British journal of ophthalmology* 8, 5, 209-226.
- 80 MARSCHALL, S., SANDER, B., MOGENSEN, M., JORGENSEN, T. M., ANDERSEN, P. E. (2011): Optical coherence tomography-current technology and applications in clinical and biomedical research. *Analytical and bioanalytical chemistry* 400, 9, 2699-2720.
- 81 MCKAY, J. S., STEELE, S. J., AHMED, G., JOHNSON, E., RATCLIFFE, K. (2009): An antibody panel for immunohistochemical analysis of the retina in Davidson's-fixed, paraffin-embedded eyes of rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 61, 2, 91-100.
- 82 MCKIBBIN, M., ALI, M., INGLEHEARN, C., SHIRES, M., BOYLE, K., HOCKING, P. M. (2014): Spectral domain optical coherence tomography imaging of the posterior segment of the eye in the retinal dysplasia and degeneration chicken, an animal model of inherited retinal degeneration. *Veterinary Ophthalmology* 17, 2, 113-119.
- 83 MCNABB, R. P., TIAN, J., FARSIU, S., IZATT, J. A., LAD, E. M., KUO, A. N. (2017): Retinal imaging in human autopsy eyes using a custom optical coherence tomography periscope. *Biomedical optics express* 8, 9, 4152-4159.
- 84 MERSON, E., KUDRYA, A. V., TRACHENKO, V. A., MERSON, D., DANIOV, V., VINOGRADOV, A. (2016): The Use of Confocal Laser Scanning Microscopy for the 3D Quantitative Characterization of Fracture Surfaces and Cleavage Facets. *Procedia Structural Integrity* 2, 533-540.
- 85 MESA, K. J., SELMIC, L. E., PANDE, P., MONROY, G. L., REAGAN, J., SAMUELSON, J., DRISKELL, E., LI, J., MARJANOVIC, M., CHANEY, E. J., BOPPART, S. A. (2017): Intraoperative optical coherence tomography for soft tissue sarcoma differentiation and margin identification. *Lasers in surgery and medicine* 49, 3, 240-248.
- 86 MEYER, D. B. (1986): The avian eye In P. D. Sturkie (Hrsg.), *Avian physiology* (38-48). New York. Springer.
- 87 MOAYED, A. A., HARIRI, S., SONG, E. S., CHO, V., BIZHEVA, K. (2011): In vivo volumetric imaging of chicken retina with ultrahigh-resolution spectral domain optical coherence tomography. *Biomedical optics express* 2, 5, 1268-1274.
- 88 MOORE, B. A., MAGGS, D. J., KIM, S., MOTTA, M. J.,

- BANDIVADEKAR, R., TELL, L. A., MURPHY, C. J. (2018): Clinical findings and normative ocular data for free-living Anna's (*Calypte anna*) and Black-chinned (*Archilochus alexandri*) Hummingbirds. *Vet Ophthalmol.*
- 89 MOORE, B. A., TEIXEIRA, L. B., SPONSEL, W. E., DUBIELZIG, R. R. (2017): The consequences of avian ocular trauma: histopathological evidence and implications of acute and chronic disease. *Veterinary Ophthalmology* 20, 6, 496-504.
- 90 MOREIRA-NETO, C. A., BERGERON, S., COBLENTZ, J., ZOROQUIAIN, P., MALONEY, S., MASTROMONACO, C., ESPOSITO, E., ROMANO, A., BELFORT NETO, R., MOREIRA, C. A., JR., BURNIER, J. V., BURNIER, M., JR. (2019): Optimizing optical coherence tomography and histopathology correlation in retinal imaging. *Canadian Journal of Ophthalmology* 54, 2, 280-287.
- 91 MULISCH, M., AESCHT, E., ROMEIS, B. (2015): Romeis-Mikroskopische Technik (19 ed.). Berlin [u.a.]. Springer Spektrum.
- 92 MÜLLER, C. G. (2010). *Untersuchungen über Chorio- und Retinopathien am Taubenauge nach artifiziell herbeigeführtem Hyphaema*. Unpublished Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- 93 MURPHY, C. J., BROOKS, D. E., KERN, T. J., QUESENBERRY, K. E., RIIS, R. C. (1983): Enucleation in birds of prey. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 183, 11, 1234-1237.
- 94 MURPHY, C. J., KERN, T. J., MCKEEVER, K., MCKEEVER, L., MACCOY, D. (1982): Ocular lesions in free-living raptors. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 181, 11, 1302-1304.
- 95 NAREDI-RAINER, N., PRESCHER, J., HARTSCHUH, A., LAMB, D. C. (2017): Confocal Microscopy. In U. Kubitscheck (Hrsg.), *Fluorescence Microscopy: From Principles to Biological Applications* (165-200). Weinheim. Wiley-VCH.
- 96 NEUMANN, M., GABEL, D. (2002): Simple method for reduction of autofluorescence in fluorescence microscopy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 50, 3, 437-439.
- 97 NICKLA, D. L., TOTONELLY, K. (2016): Brief light exposure at night disrupts the circadian rhythms in eye growth and choroidal thickness in chicks. *Exp Eye Res* 146, 189-195.
- 98 NIEMELA, T., VIREN, T., LIUKKONEN, J., ARGUELLES, D., TE MOLLER, N. C., PUHAKKA, P. H., JURVELIN, J. S., TULAMO, R. M., TOYRAS, J. (2014): Application of optical coherence tomography enhances reproducibility of arthroscopic evaluation of equine joints. *Acta*

- veterinaria scandinavica 56, 1, 1-8.
- 99 OEHME, H. (1962): Das Auge von Mauersegler, Star und Amsel. Journal für Ornithologie 103, 2, 187-212.
- 100 OREOPOULOS, J., BERMAN, R., BROWNE, M. (2014): Spinning-disk confocal microscopy: present technology and future trends. In J. C. Waters & T. Wittman (Hrsg.): Methods in Cell Biology. Quantitative imaging in cell biology (Vol. 123, 153-175). Amsterdam, Heidelberg [u.a.]. Elsevier, Academic Press.
- 101 OROSZ, S. E. (1996): Principles of avian clinical neuroanatomy. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine 5, 3, 127-139.
- 102 PARRY, H. B. (1953): Degenerations of the Dog Retina : I. Structure and Development of the Retina of the Normal Dog. The British Journal of Ophthalmology 37, 7, 385-404.
- 103 PETTIGREW, J. D., WALLMAN, J., WILDSOET, C. F. (1990): Saccadic oscillations facilitate ocular perfusion from the avian pecten. Nature 343, 6256, 362-363.
- 104 PINTO, N. I., GILGER, B. C. (2014): Spectral-domain optical coherence tomography evaluation of the cornea, retina, and optic nerve in normal horses. Veterinary Ophthalmology 17 140-148.
- 105 PIRIE, C. G., ALARIO, A. F., BARYSAUSKAS, C. M., GRADIL, C., URICCHIO, C. K. (2014): Manual corneal thickness measurements of healthy equine eyes using a portable spectral-domain optical coherence tomography device. Equine veterinary journal 46, 5, 631-634.
- 106 PODOLEANU, A. G. (2012): Optical coherence tomography. Journal of Microscopy 247, 3, 209-219.
- 107 POPESCU, D. P., CHOO-SMITH, L. P., FLUERARU, C., MAO, Y., CHANG, S., DISANO, J., SHERIF, S., SOWA, M. G. (2011): Optical coherence tomography: fundamental principles, instrumental designs and biomedical applications. Biophysical reviews 3, 3, 155.
- 108 PRATI, F., REGAR, E., MINTZ, G. S., ARBUSTINI, E., DI MARIO, C., JANG, I. K., AKASAKA, T., COSTA, M., GUAGLIUMI, G., GRUBE, E., OZAKI, Y., PINTO, F., SERRUYS, P. W., EXPERT'S, O. C. T. R. D. (2010): Expert review document on methodology, terminology, and clinical applications of optical coherence tomography: physical principles, methodology of image acquisition, and clinical application for assessment of coronary arteries and atherosclerosis. European heart journal 31, 4, 401-415.
- 109 PUMPHREY, R. J. (1948): The Theory of the Fovea. Journal of

- Experimental Biology 25, 3, 299.
- 110 RAULT, J. L., CLARK, K., GROVES, P. J., CRONIN, G. M. (2017): Light intensity of 5 or 20 lux on broiler behavior, welfare and productivity. Poult Sci 96, 4, 779-787.
- 111 RAUSCHER, F. G., AZMANIS, P., KÖRBER, N., KOCH, C., HÜBEL, J., VETTERLEIN, W., WERNER, B., THIELEBEIN, J., DAWCZYNSKI, J., WIEDEMANN, P., REICHENBACH, A., FRANCKE, M., KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.-E. (2013): Optical Coherence Tomography as a Diagnostic Tool for Retinal Pathologies in Avian Ophthalmology, OCT for Diagnosis of Avian Retinal Pathologies. Investigative Ophthalmology & Visual Science 54, 13, 8259-8269.
- 112 RAVELHOFER, K. (1996). *Pathologisch-anatomische Untersuchungen an Augen verschiedener Vogelspezies*. Unpublished Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- 113 REESE, S., KORBEL, R., KÖNIG, H.-G. (2009): Sehorgan (Organum visus) Anatomie der Vögel: Klinische Aspekte und Propädeutik. Zier-, Greif-, Zoo-, Wildvögel und Wirtschaftsgeflügel (229-256). Stuttgart. Schattauer.
- 114 REISER, B. J., IGNACIO, T. S., WANG, Y., TABAN, M., GRAFF, J. M., SWEET, P., CHEN, Z., CHUCK, R. S. (2005): In vitro measurement of rabbit corneal epithelial thickness using ultrahigh resolution optical coherence tomography. Veterinary Ophthalmology 8, 2, 85-88.
- 115 RENSHAW, S. (2017): Immunohistochemistry and Immunocytochemistry: Essential Methods (2 ed.). Chichester, West Sussex. Wiley Blackwell.
- 116 REX, T. S., FARISS, R. N., LEWIS, G. P., LINBERG, K. A., SOKAL, I., FISHER, S. K. (2002): A survey of molecular expression by photoreceptors after experimental retinal detachment. Investigative ophthalmology & visual science 43, 4, 1234-1247.
- 117 ROCHON-DUVIGNEAUD, A. (1933): Recherches sur l'oeil et la vision chez les vertébrés. Imprimerie Barnéoud.
- 118 ROCHON-DUVIGNEAUD, A. (1943): Les yeux et la vision des vertébrés. Masson Paris.
- 119 ROSERO, A., ZARSKY, V., CVRCKOVA, F. (2014): Visualizing and quantifying the in vivo structure and dynamics of the *Arabidopsis* cortical cytoskeleton using CLSM and VAEM. Methods in Molecular Biology 1080, 87-97.
- 120 RUGGERI, M., MAJOR, J. C., JR., MCKEOWN, C., KNIGHTON, R.

- W., PULIAFITO, C. A., JIAO, S. (2010): Retinal structure of birds of prey revealed by ultra-high resolution spectral-domain optical coherence tomography. *Investigative ophthalmology & visual science* 51, 11, 5789-5795.
- 121 SATHYAN, P., SHILPA, S., ANITHA, A. (2012): Optical Coherence Tomography in Glaucoma. *Journal of Current Glaucoma Practice* 6, 1, 1-5.
- 122 SAUNDERS, L. Z., JUBB, K. V. (1961): Notes on Technique for Postmortem Examination of the Eye. *The Canadian Veterinary Journal* 2, 4, 123-129.
- 123 SCHAUDIG, U. H., GLAEFKE, C., SCHOLZ, F., RICHARD, G. (2000): Optical coherence tomography for retinal thickness measurement in diabetic patients without clinically significant macular edema. *Ophthalmic surgery and lasers* 31, 3, 182-186.
- 124 SCHULZE, C. (2016). *Zur Morphologie der physiologischen Foveae am Augenhintergrund von Greifvögeln und Eulen mittels Optischer Kohärenztomografie (OCT)*. Unpublished Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- 125 SEIBOLD, L. K., KAHOOK, M. Y. (2012): The effect of software upgrade on optical coherence tomography measurement of the retinal nerve fiber layer thickness. *Middle East African journal of ophthalmology* 19, 4, 392-396.
- 126 SELMIC, L. E., SAMUELSON, J., REAGAN, J. K., MESA, K. J., DRISKELL, E., LI, J., MARJANOVIC, M., BOPPART, S. A. (2019): Intra-operative imaging of surgical margins of canine soft tissue sarcoma using optical coherence tomography. *Veterinary and comparative oncology* 17, 1, 80-88.
- 127 SERUCA, C., MOLINA-LOPEZ, R., PENA, T., LEIVA, M. (2012): Ocular consequences of blunt trauma in two species of nocturnal raptors (*Athene noctua* and *Otus scops*). *Veterinary Ophthalmology* 15, 4, 236-244.
- 128 SHARMA, S. P., RIJAL, J., DAHAL, K. (2019): Optical coherence tomography guidance in percutaneous coronary intervention: a meta-analysis of randomized controlled trials (2018/06/28 ed. Vol. 34). Tokyo. Springer Japan.
- 129 SIGG, R. E. (2016). *Optische Kohärenztomographie am vorderen Augensegment bei Greifvögeln*. Unpublished Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- 130 SINGLA, N., DUBEY, K., SRIVASTAVA, V. (2019): Automated assessment of breast cancer margin in optical coherence tomography

- images via pretrained convolutional neural network. *Journal of biophotonics* 12, 3, e201800255.
- 131 SLONAKER, J. R. (1918): A physiological study of the anatomy of the eye and its accessory parts of the english sparrow (*passer domesticus*). *Journal of Morphology* 31, 3, 351-459.
- 132 SPAIDE, R. F. (2012): Questioning Optical Coherence Tomography. *Ophthalmology* 119, 11, 2203-2204.e2201.
- 133 SPAIDE, R. F., CURCIO, C. A. (2011): Anatomical correlates to the bands seen in the outer retina by optical coherence tomography: literature review and model. *Retina (Philadelphia, Pa.)* 31, 8, 1609-1619.
- 134 TACKENBERG, M. A., TUCKER, B. A., SWIFT, J. S., JIANG, C., REDENTI, S., GREENBERG, K. P., FLANNERY, J. G., REICHENBACH, A., YOUNG, M. J. (2009): Müller cell activation, proliferation and migration following laser injury. *Molecular vision* 15, 1886-1896.
- 135 TE MOLLER, N. C., BROMMER, H., LIUKKONEN, J., VIREN, T., TIMONEN, M., PUHAKKA, P. H., JURVELIN, J. S., VAN WEEREN, P. R., TOYRAS, J. (2013): Arthroscopic optical coherence tomography provides detailed information on articular cartilage lesions in horses. *The Veterinary Journal* 197, 3, 589-595.
- 136 TOMLINS, P. H., WANG, R. (2005): Theory, developments and applications of optical coherence tomography. *Journal of Physics D: Applied Physics* 38, 15, 2519.
- 137 TOTH, C. A., NARAYAN, D. G., BOPPART, S. A., ET AL. (1997): A comparison of retinal morphology viewed by optical coherence tomography and by light microscopy. *Archives of Ophthalmology* 115, 11, 1425-1428.
- 138 TRAN, H., JAN, N.-J., HU, D., VOORHEES, A., SCHUMAN, J. S., SMITH, M. A., WOLLSTEIN, G., SIGAL, I. A. (2017): Formalin Fixation and Cryosectioning Cause Only Minimal Changes in Shape or Size of Ocular Tissues. *Scientific Reports* 7, 12065.
- 139 TUSLER, C. A., MAGGS, D. J., KASS, P. H., PAUL-MURPHY, J. R., SCHWAB, I. R., MURPHY, C. J. (2015): Spectral domain optical coherence tomography imaging of spectacular ecdysis in the royal python (*Python regius*). *Veterinary Ophthalmology* 18 1-7.
- 140 VAN VELTHOVEN, M. E. J., FABER, D. J., VERBRAAK, F. D., VAN LEEUWEN, T. G., DE SMET, M. D. (2007): Recent developments in optical coherence tomography for imaging the retina. *Progress in Retinal and Eye Research* 26, 1, 57-77.

- 141 VELASCO GALLEGOS, M. L. (2015). *Imaging of physiological retinal structures in various raptor species using Optical Coherence Tomography (OCT)*. Unpublished Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- 142 VIGNALI, L., SOLINAS, E., EMANUELE, E. (2014): Research and Clinical Applications of Optical Coherence Tomography in Invasive Cardiology: A Review. *Current Cardiology Reviews* 10, 4, 369-376.
- 143 WALDE, I., SCHÄFFER, E. H. (2008): Untersuchung des Auges und seiner Adnexe Augenheilkunde Lehrbuch und Atlas; Hund, Katze, Kaninchen und Meerschweinchen (45 - 84). Stuttgart [u.a.]. Schattauer.
- 144 WALLS, G. L. (1942): The vertebrate eye and its adaptive radiation. New York, London. Hafner Publishing Company.
- 145 WANG, D., SONG, P., WANG, S., SUN, D., WANG, Y., ZHANG, Y., GAO, H. (2016): Laser Scanning In Vivo Confocal Microscopy of Clear Grafts after Penetrating Keratoplasty. *BioMed research international* 2016, 5159746.
- 146 WANG, J. C., MCKAY, K. M., SOOD, A. B., LAINS, I., SOBRIN, L., MILLER, J. B. (2019): Comparison of choroidal neovascularization secondary to white dot syndromes and age-related macular degeneration by using optical coherence tomography angiography. *Clinical ophthalmology* 13, 95-105.
- 147 WANG, L. V., WU, H.-I. (2007): Optical Coherence Tomography Biomedical Optics: Principles and Imaging (181-215). Hoboken, NJ, USA. John Wiley & Sons, Inc.
- 148 WERTHER, K., HUFEN, H., STROBEL, B., STEIN, K., KORBEL, R. (2011). *Effects of Formalin Fixation on Avian Eye*. Paper presented at the Proceedings EAAV Madrid.
- 149 WILHELM, S., GRÖBLER, B., GLUCH, M., HEINZ, H. (2003): Mikroskopie von Carl Zeiss. Grundlagen. Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie. In C. Z. Mikroskopsysteme (Ed.). Jena: Carl Zeiss.
- 150 WISELY, C. E., SAYED, J. A., TAMEZ, H., ZELINKA, C., ABDELRAHMAN, M. H., FISCHER, A. J., CEBULLA, C. M. (2017): The chick eye in vision research: An excellent model for the study of ocular disease. *Progress in retinal and eye research* 61, 72-97.
- 151 WONG, I. Y., KOIZUMI, H., LAI, W. W. (2011): Enhanced depth imaging optical coherence tomography. *Ophthalmic Surgery, Lasers and Imaging Retina* 42 4, 75-84.
- 152 WOOD, C. A. (1917): The fundus oculi of birds, especially as viewed by

- the ophthalmoscope. A study in comparative anatomy and physiology. Chicago The Lakeside Press.
- 153 XIE, W., ZHAO, M., TSAI, S. H., BURKES, W. L., POTTS, L. B., XU, W., PAYNE, H. R., HEIN, T. W., KUO, L., ROSA, R. H., JR. (2018): Correlation of spectral domain optical coherence tomography with histology and electron microscopy in the porcine retina. *Experimental Eye Research* 177, 181-190.
- 154 YAHIA, S. B., KHAIRALLAH, M. (2009): Ocular manifestations of West Nile virus infection. *International journal of medical sciences* 6, 3, 114-115.
- 155 YANOFF, M., ZIMMERMAN, L. E., FINE, B. S. (1965): Glutaraldehyde Fixation of Whole Eyes. *American journal of clinical pathology* 44, 2, 167-171.
- 156 YEMUL, K. S., ZYSK, A. M., RICHARDSON, A. L., TANGELLA, K. V., JACOBS, L. K. (2019): Interpretation of Optical Coherence Tomography Images for Breast Tissue Assessment. *Surgical innovation* 26, 1, 50-56.
- 157 YOSHIDA, R., TAKAGI, K., MORISHIMA, I., TSUBOI, H. (2019): Coil embolization of pseudoaneurysm as a complication of excimer laser coronary angioplasty: insights from intravascular ultrasound and optical coherence tomography findings. *J Journal of Medical Ultrasonics* 46, 2, 245-249.
- 158 YOSHIMURA, N., HANGAI, M. (2014): OCT Atlas. Berlin [u.a.]. Springer Berlin Heidelberg.

IX. ANHANG

9.1. Befundbogen Augenuntersuchung

Patientendatenblatt

Befundbogen Augenuntersuchung Vogel
- Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische -
Elisabeth Hagen

Datum: Uhrzeit: Dauer der OCT- Untersuchung:
Veteranummer: amb. Stat.

Patient
Spezies: Alter: Geschlecht:
Vorbericht

.....
.....

Allgemeinuntersuchung

Verhalten:

Augen, Ohren:

Nares, Schnabelhöhle:

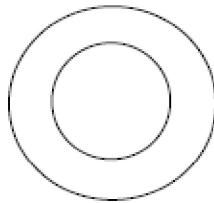
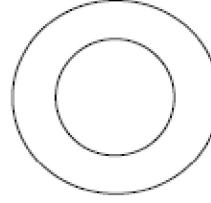
Haut, Federn, Horn:

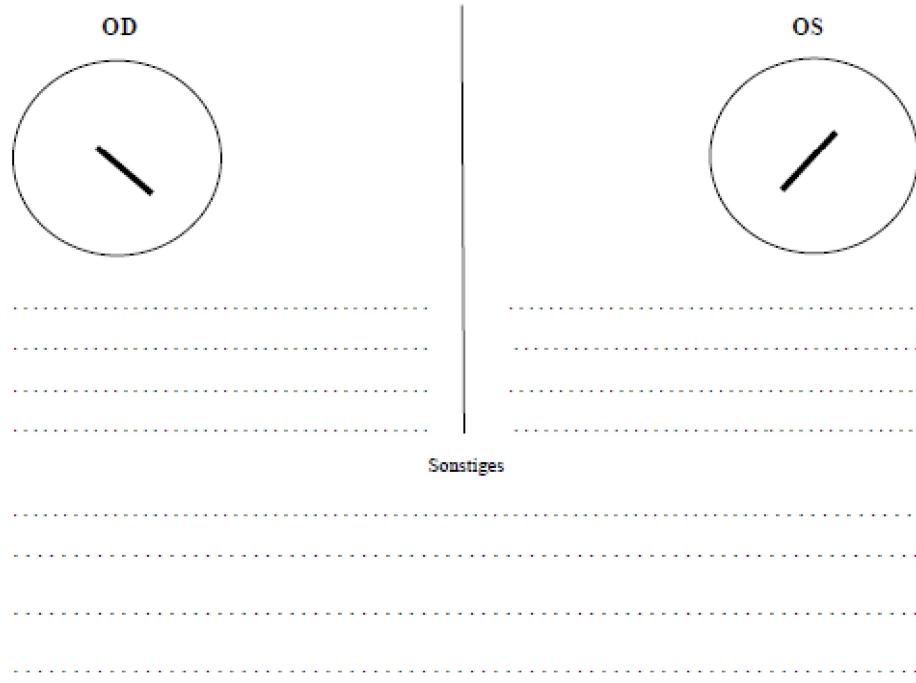
Kropf, Abdomen, Kloake:

EZ: Gewicht:

Extremitäten, Gelenke:

Locus minoris resistantiae:

OD	Untersuchungsergebnisse	OS
		
Adspektion:		Adspektion:
I.O.D.: mmHg		I.O.D.: mmHg
Spaltlampe:		Spaltlampe:
.....	
.....	
Evtl. Floureszein:		evtl. Floureszein:

Indirekte Ophthalmoskopie**Parameter Enukleation****OD***Post Bulbus ex // postfixation*

Ø Cornea //

Gewicht: //

Parazentesevolumen:

OS*Post Bulbus ex // postfixation*

Ø Cornea //

Gewicht: //

Parazentesevolumen:

9.2 Messwerte

Erste Messung OCT (Messungen in µm)

Tiernr.	Spezies	Seite (1-rechts; 2-links)	Messpunkt (1-temporal; 2-nasal)	Tiefe F.c. OCT 1	Tiefe F.t. OCT 1	Schicht 1 OCT 1	Schicht 2 OCT 1	Schicht 3 OCT 1	Schicht 4 OCT 1	Gesamtdicke OCT 1
2	Sperber	2	1	198		47	79	171	34	331
2	Sperber	2	2			57	68	171	29	328
4	Sperber	2	2	158		56	76	167	27	328
4	Sperber	2	1			67	74	128	28	297
5	Turmfalke	2	2	294	132	59	91	229	27	407
5	Turmfalke	2	1			74	89	207	24	391
6	Mäusebussard	2	2	174		61	85	202	25	373
6	Mäusebussard	2	1			77	79	173	31	360
6	Mäusebussard	1	1	163		43	99	200	26	365
6	Mäusebussard	1	2			55	90	205	28	378
9	Turmfalke	2	1	259	85	69	87	188	27	369
9	Turmfalke	2	2			81	84	209	27	403
10	Turmfalke	1	1	280	106	57	88	190	37	374
10	Turmfalke	1	2			59	85	224	34	401
10	Turmfalke	2	1	265		69	85	203	25	383
10	Turmfalke	2	2			54	89	225	31	395
12	Turmfalke	2	1	244	77	59	98	208	23	387
12	Turmfalke	2	2			71	92	215	23	395
13	Turmfalke	1	1	295	131	79	97	177	25	378
13	Turmfalke	1	2			59	96	204	27	384
13	Turmfalke	2	1	275		70	93	194	28	384
13	Turmfalke	2	2			61	96	208	23	386
14	Mäusebussard	2	1	308	128	84	85	189	28	383
14	Mäusebussard	2	2			57	97	215	23	390
16	Turmfalke	1	1	233		71	84	193	23	374
16	Turmfalke	1	2			64	84	206	24	379
16	Turmfalke	2	1	250	102	70	84	129	31	311
16	Turmfalke	2	2			64	81	213	24	383
17	Mäusebussard	1	1	237	118	57	97	184	35	369
17	Mäusebussard	1	2			48	104	195	33	379
18	Turmfalke	1	1	268	112	67	84	197	25	369
18	Turmfalke	1	2			55	86	215	27	383
18	Turmfalke	2	1	261	112	57	99	195	27	375
18	Turmfalke	2	2			58	93	217	25	393
19	Mäusebussard	1	2	239		25	111	215	28	380
19	Mäusebussard	2	1			63	77	188	28	356
19	Mäusebussard	2	2			58	85	194	29	369
20	Turmfalke	1	1	224	118	83	78	193	25	379
20	Turmfalke	1	2			64	77	211	27	381
20	Turmfalke	2	2	158	135	67	92	199	30	388
20	Turmfalke	2	1			75	79	194	25	374
21	Habicht	2	1	141		50	80	181	27	340
21	Habicht	2	2			64	69	181	28	345
22	Mäusebussard	1	1	120	59	63	88	155	29	335
22	Mäusebussard	1	2			45	91	190	31	353
22	Mäusebussard	2	1	278		51	77	202	24	354
22	Mäusebussard	2	2			55	86	191	27	356
23	Turmfalke	1	1	284	118	61	103	201	25	388
23	Turmfalke	1	2			64	88	219	30	404
23	Turmfalke	2	1	182	118	64	93	212	18	387
23	Turmfalke	2	2			67	97	209	28	401
24	Sperber	1	1	268	30	71	81	134	30	312
24	Sperber	1	2			47	78	176	32	331
26	Habicht	1	1	138		151	54	102	25	330
26	Habicht	1	2			61	82	195	29	359
26	Habicht	2	1	225		46	90	183	27	346
26	Habicht	2	2			55	87	198	28	364
27	Sperber	1	2	155		51	79	167	28	326

Zweite Messung OCT (Messungen in µm)

Tiernr.	Spezies	Seite (1-rechts; 2-links)	Messpunkt (1-temporal; 2-nasal)	Tiefe F.c. OCT 2	Tiefe F.t. OCT 2	Schicht 1 OCT 2	Schicht 2 OCT 2	Schicht 3 OCT 2	Schicht 4 OCT 2	Gesamtdicke OCT 2
2	Sperber	2	1	247		51	79	164	28	321
2	Sperber	2	2			56	75	167	26	324
4	Sperber	2	2	201		59	77	162	24	318
4	Sperber	2	1							
5	Turmfalke	2	2	181	123	66	83	233	20	402
5	Turmfalke	2	1			74	82	210	25	391
6	Mäusebussard	2	2	284		59	94	197	31	378
6	Mäusebussard	2	1			74	79	171	33	358
6	Mäusebussard	1	1	225		39	97	204	35	376
6	Mäusebussard	1	2			64	81	202	25	370
9	Turmfalke	2	1	215	93	66	95	177	24	361
9	Turmfalke	2	2			75	80	212	26	392
10	Turmfalke	1	1	186	118					
10	Turmfalke	1	2			59	80	231	34	410
10	Turmfalke	2	1	138		81	82	203	31	394
10	Turmfalke	2	2			64	86	223	23	395
12	Turmfalke	2	1	232	67					
12	Turmfalke	2	2			67	90	219	21	396
13	Turmfalke	1	1	301	98	78	90	180	27	373
13	Turmfalke	1	2			53	98	206	27	386
13	Turmfalke	2	1	291		70	85	199	28	380
13	Turmfalke	2	2			53	92	210	27	382
14	Mäusebussard	2	1	171	96	82	82	188	27	381
14	Mäusebussard	2	2			66	87	216	28	395
16	Turmfalke	1	1			81	86	203	27	396
16	Turmfalke	1	2			54	78	208	31	369
16	Turmfalke	2	1		118	76	81	128	28	311
16	Turmfalke	2	2			65	89	210	24	385
17	Mäusebussard	1	1	172	124	55	93	189	27	367
17	Mäusebussard	1	2			43	107	196	28	372
18	Turmfalke	1	1	191		69	82	196	25	374
18	Turmfalke	1	2			62	89	206	26	383
18	Turmfalke	2	1	242	97					
18	Turmfalke	2	2			61	98	210	23	393
19	Mäusebussard	1	2			43	89	220	27	377
19	Mäusebussard	2	1			43	92	190	28	356
19	Mäusebussard	2	2			64	77	195	31	367
20	Turmfalke	1	1	214	100	83	83	189	26	380
20	Turmfalke	1	2			67	88	203	30	386
20	Turmfalke	2	2	228	139					
20	Turmfalke	2	1			70	82	195	25	370
21	Habicht	2	1	131		58	80	176	28	341
21	Habicht	2	2			57	75	187	26	340
22	Mäusebussard	1	1			65	78	166	32	334
22	Mäusebussard	1	2			45	88	192	28	353
22	Mäusebussard	2	1	269		49	88	196	25	359
22	Mäusebussard	2	2			57	81	188	27	354
23	Turmfalke	1	1	234	104					
23	Turmfalke	1	2			62	94	217	28	401
23	Turmfalke	2	1	168	105	62	96	210	24	388
23	Turmfalke	2	2							
24	Sperber	1	1	183	32	80	72	136	28	315
24	Sperber	1	2			51	80	179	29	338
26	Habicht	1	1	117		138	58	96	36	328
26	Habicht	1	2			51	91	191	23	355
26	Habicht	2	1	170		43	86	181	29	339
26	Habicht	2	2			44	89	183	28	344
27	Sperber	1	2	252		47	82	164	26	320

Messung Konfokalmikroskopie (Messungen in μm)

Tiernr.	Spezies	Seite (1-rechts; 2-links)	Messpunkt (1-temporal; 2-nasal)	Tiefe F.c. CLSM	Tiefe F.t. CLSM	Schicht 1 CLSM	Schicht 2 CLSM	Schicht 3 CLSM	Schicht 4 CLSM	Gesamtdicke CLSM
2	Sperber	2	1	79		60	30	76		
2	Sperber	2	2			78	20	50		
4	Sperber	2	2	271		70	39	97	18	233
4	Sperber	2	1			51	38	131	14	241
5	Turmfalke	2	2	363	128	98	56	185	17	377
5	Turmfalke	2	1			73	66	208	17	381
6	Mäusebussard	2	2	352		70	61	155	24	320
6	Mäusebussard	2	1			62	60	157	20	306
6	Mäusebussard	1	1	332		61	73	178	22	338
6	Mäusebussard	1	2			67	63	150	13	294
9	Turmfalke	2	1	294	140	77	71	194	19	371
9	Turmfalke	2	2			80	65	199	17	370
10	Turmfalke	1	1	189	95	56	70	233	20	384
10	Turmfalke	1	2			81	62	206	20	376
10	Turmfalke	2	1	125		65	70	199	19	375
10	Turmfalke	2	2			78	59	186	17	356
12	Turmfalke	2	1	313	158	70	62	183	20	347
12	Turmfalke	2	2			71	73	188	20	360
13	Turmfalke	1	1	432	79	74	62	174	17	340
13	Turmfalke	1	2			68	69	197	21	364
13	Turmfalke	2	1	301		82	65	181	22	350
13	Turmfalke	2	2			69	73	200	20	358
14	Mäusebussard	2	1	358	184	81	67	211	25	403
14	Mäusebussard	2	2			63	79	221	23	398
16	Turmfalke	1	1	399	83	71	71	199	19	365
16	Turmfalke	1	2			82	64	189	17	354
16	Turmfalke	2	1	373	120	82	64	145	32	315
16	Turmfalke	2	2			80	71	217	19	392
17	Mäusebussard	1	1		70	71	85	184	19	365
17	Mäusebussard	1	2			76	71	165	20	332
18	Turmfalke	1	1	188	77	84	65	187	21	365
18	Turmfalke	1	2			85	75	192	16	367
18	Turmfalke	2	1	319	110	66	78	219	20	385
18	Turmfalke	2	2			63	71	180	30	336
19	Mäusebussard	1	2		301	67	66	226	18	386
19	Mäusebussard	2	1	314		61	77	183	17	340
19	Mäusebussard	2	2			76	73	192	17	359
20	Turmfalke	1	1	371	149	95	65	216	20	420
20	Turmfalke	1	2			82	73	212	19	385
20	Turmfalke	2	2	333	166	77	71	226	20	409
20	Turmfalke	2	1			81	63	183	17	350
21	Habicht	2	1	284		76	60	155	18	306
21	Habicht	2	2			72	54	166	20	315
22	Mäusebussard	1	1	306	128	75	63	193	28	373
22	Mäusebussard	1	2			64	70	202	22	358
22	Mäusebussard	2	1	321		64	74	217	17	374
22	Mäusebussard	2	2			66	86	203	20	376
23	Turmfalke	1	1	420	316	73	73	211	18	378
23	Turmfalke	1	2			80	86	209	18	392
23	Turmfalke	2	1	380	124	67		229	21	
23	Turmfalke	2	2			72	76	212	20	386
24	Sperber	1	1	250		120	34	76		
24	Sperber	1	2			75	57	119	19	279
26	Habicht	1	1	296		104	45	128		
26	Habicht	1	2			55	67	195	25	341
26	Habicht	2	1	319				186	25	
26	Habicht	2	2			59			24	
27	Sperber	1	2			65	54	141	23	277

9.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Links: Tigroider Fundus (OS) eines nachaktiven Virginia-Uhus (<i>Bubo virginianus</i>); Rechts: Fundus (OS) eines tagaktiven Weißkopfseeadlers (<i>Haliaeetus leucocephalus</i>).....4
Abbildung 2: Retinale Schichtung der Pars optica retinae eines Haushuhnes (<i>Gallus gallus domesticus</i>)4
Abbildung 3: Lokalisation der Foveae bei tagaktiven Greifvögeln7
Abbildung 4: Sichtfeld eines Greifvogels7
Abbildung 5: Aufbau einer Time Domain - OCT12
Abbildung 6: 3D-Fundusaufsicht des linken Auges eines Turmfalken (<i>Falco tinnunculus</i>).....13
Abbildung 7: Oculus sinister mit Fovea centralis eines Turmfalken (<i>Falco tinnunculus</i>).....16
Abbildung 8: Oculus dexter mit Fovea centralis eines Mäusebussards (<i>Buteo buteo</i>)16
Abbildung 9: Oculus dexter mit Fovea centralis eines Mäusebussards (<i>Buteo buteo</i>)18
Abbildung 10: Fundus eines Wespenbussards (<i>Pernis apivorus</i>).....18
Abbildung 11: Oculus dexter eines Mäusebussards (<i>Buteo buteo</i>)19
Abbildung 12: Prinzip der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie21
Abbildung 13: Vergleich Fluoreszenzmikroskop mit und ohne Spinning Disk23
Abbildung 14: Direkte und indirekte Immunfluoreszenz23
Abbildung 15: Schema der (Strept-) Avidin-Biotin-Komplex Technik25
Abbildung 16: Aufbau SPECTRALIS® HRA+OCT34
Abbildung 17: Aufnahmefenster des OCT-Geräts35
Abbildung 18: Fixation eines Mäusebussards (<i>Buteo buteo</i>) für die OCT-Untersuchung.....37
Abbildung 19: Bestimmung der Foveatiefen in der OCT38
Abbildung 20: Bestimmung der Messpunkte in der OCT39
Abbildung 21: Vermessung der Retinaschichten in der OCT39
Abbildung 22: Bestimmung der Schichtdicken40
Abbildung 23: Darstellung der OCT-Aufnahme und Bestimmung der Foveatiefen in Pixel41
Abbildung 24: Darstellung der OCT-Aufnahme und Bestimmung der Foveatiefen in µm.....41
Abbildung 25: Kalottierung des Bulbus43
Abbildung 26: Zurechtschneiden der Probengröße44
Abbildung 27: Ausrichtung der Probe in der Einbettform.....45
Abbildung 28: Bestimmung der Foveatiefen in der CLSM49
Abbildung 29: Auswertung der CLSM-Aufnahmen mithilfe der Stereo Investigator Software ...49
Abbildung 30: Vermessung der Retinaschichten in der CLSM.....50
Abbildung 31: Gewicht der Augen vor (ante) und nach (post) der Fixation52
Abbildung 32: Korneadurchmesser vor (ante) und nach (post) der Fixation53
Abbildung 33: Verdünnungsreihe Anti-Glutamin-Synthetase, Sperberretina (<i>Accipiter nisus</i>)...54
Abbildung 34: Verdünnungsreihe PNA, Sperberretina (<i>Accipiter nisus</i>).....55
Abbildung 35: Verdünnungsreihe Anti-Glutamin-Synthetase, Waldkauzretina (<i>Strix aluco</i>).....55

Abbildung 36: Verdünnungsreihe PNA, Waldkauzretina (<i>Strix aluco</i>).....	55
Abbildung 37: Oculus dexter des Waldkauzes (<i>Strix aluco</i>) 1.....	59
Abbildung 38: Oculus dexter des Waldkauzes (<i>Strix aluco</i>) 2.....	60
Abbildung 39: Oculus sinister des Waldkauzes (<i>Strix aluco</i>) 2	61
Abbildung 40: Oculus dexter des Waldkauzes (<i>Strix aluco</i>) 3.....	62
Abbildung 41: Oculus sinsiter des Waldkauzes (<i>Strix aluco</i>) 3	63
Abbildung 42: Oculus sinsiter des Mäusebussards (<i>Buteo buteo</i>).....	64
Abbildung 43: Oculus sinister des Mäusebussards (<i>Buteo buteo</i>).....	65
Abbildung 44: Oculus dexter eines Waldkauzes (<i>Strix aluco</i>).....	66
Abbildung 45: Oculus dexter eines Waldkauzes (<i>Strix aluco</i>).....	67
Abbildung 46: Oculus sinister eines Waldkauzes (<i>Strix aluco</i>)	67
Abbildung 47: Oculus dexter eines Waldkauzes (<i>Strix aluco</i>).....	68
Abbildung 48: Oculus sinister einer Waldohreule (<i>Asio otus</i>).....	68
Abbildung 49: Oculus dexter Waldkauz (<i>Strix aluco</i>)	69
Abbildung 50: OCT-Darstellung der Retinaschichten	70
Abbildung 51: CLSM – Retinaschichten im Bereich der Fovea.....	71
Abbildung 52: CLSM – Retinaschichten in der Peripherie	71
Abbildung 53: Retinale Schichtung im Bereich der Fovea temporalis	72
Abbildung 54: Zellkernschichten im Vergleich nacht- und tagaktiver Vogel	73
Abbildung 55: Müllergliazellen im Vergleich tag- und nachaktiv	73
Abbildung 56: PNA Markierung im Vergleich tag- und nachaktiv	74
Abbildung 57: Vignettierung im OCT-Bild	74
Abbildung 58: Risse innerhalb Retinaschichten in der CLSM-Aufnahme.....	75
Abbildung 59: Faltenbildung innerhalb der CLSM-Aufnahme	75
Abbildung 60: Umschlagen des Schnittes innerhalb der CLSM-Aufnahme	76
Abbildung 61: Bland-Altman-Plot: Tiefe der Fovea centralis	77
Abbildung 62: Bland-Altman-Plot: Tiefe der Fovea temporalis.....	78
Abbildung 63: Bland-Altman-Plot, Schicht 1 (ILM + NFL + GCL).....	79
Abbildung 64: Bland-Altman-Plot: Schicht 2 (IPL)	79
Abbildung 65: Bland-Altman-Plot: Schicht 3 (INL + OPL + ONL + ELM)	80
Abbildung 66: Bland-Altman-Plot: Schicht 4 (IS).....	81
Abbildung 67: Bland-Altman-Plot: Gesamtdicke (exklusive OS/RPE)	81
Abbildung 68: Oculus dexter des Waldkauzes (<i>Strix aluco</i>) 1.....	82
Abbildung 69: Vergleich OCT und CLSM des Waldkauzes (<i>Strix aluco</i>) 1, Oculus dexter	83
Abbildung 70: Oculus sinister des Waldkauzes (<i>Strix aluco</i>) 1	84
Abbildung 71: Vergleich OCT und CLSM des Waldkauzes (<i>Strix aluco</i>) 1, Oculus sinister	85
Abbildung 72: Oculus dexter des Waldkauzes (<i>Strix aluco</i>) 2.....	86
Abbildung 73: Vergleich OCT und CLSM des Waldkauzes (<i>Strix aluco</i>) 2, Oculus dexter	87
Abbildung 74: Oculus sinister des Waldkauzes (<i>Strix aluco</i>) 2	88

Abbildung 75: CLSM des Waldkauzes (<i>Strix aluco</i>) 2, Oculus sinister	88
Abbildung 76: Pathologische Retina eines Weißkopfseeadlers (<i>Haliaeetus leucocephalus</i>)	89
Abbildung 77: Multicolorfärbung pathologische Retina eines Weißkopfseeadlers (<i>Haliaeetus leucocephalus</i>)	90

9.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Art und Anzahl des Patientenguts	30
Tabelle 2: Parazentesevolumina zur Fixation	51

X. DANKSAGUNG

In erster Linie möchte ich Herrn Prof. Korbel herzlichst danken für die Überlassung des spannenden Themas und die ansteckende Begeisterung für die Ophthalmologie. Vielen Dank für die Bereitstellung des Instrumentariums und die Unterstützung!

Frau Regina Sigg möchte ich für die Co-Betreuung des Projekts danken. Vielen lieben Dank, für dein immerwährendes offenes Ohr, für dein Wissen, dein Engagement, die sorgfältige Durchsicht dieser Arbeit und deine Unterstützung! Eine bessere Co-Betreuung hätte ich mir nicht wünschen können. Danke!

Mein Dank gilt auch allen weiteren Mitarbeitern der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische für deren Unterstützung und die schöne Zeit. Frau Monika Rinder danke ich insbesondere für die Unterstützung in Tierschutzfragen. Für eine Einführung in das Thema, dem Wissensaustausch und die Zeit möchte ich ebenso herzlichst Frau Katayoon Ghaffari danken.

Bei Herrn Prof. Schmitz möchte ich mich für die tolle Kooperation bedanken, ohne die die Dissertation nicht umsetzbar gewesen wäre. Vielen lieben Dank für die vielen Anregungen und Besprechungen! Bedanken möchte ich mich ebenso bei den Mitarbeiterinnen der Neuroanatomie, besonders bei Frau Aschauer und Frau Baltruschat. Liebe Astrid, ich danke dir für die Einführung in die Immunhistochemie und deine wertvolle Hilfe! Liebe Beate, dir danke ich ebenfalls für deine Unterstützung und die zahlreichen Stunden am Mikroskop!

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Reese für die statistische Auswertung und die wertvolle Beratung bedanken.

Herrn Wilhelm Holzer danke ich vom Herzen für die Hilfsbereitschaft, die unschätzbar wertvolle Zusammenarbeit und sein herausragendes Engagement für Greifvögel.

Ein besonderer Dank gilt zudem meinen Eltern für die stetige Unterstützung, ohne die das Studium und die Dissertation nicht möglich gewesen wäre. Ein großes Dankeschön ebenso an meine Freunde für das Mitleiden, Mitfeiern und Mitfreuen, sowie an Christin für die Unterstützung bei der Fotobearbeitung. Und zu guter Letzt möchte ich mich vom ganzen Herzen bei Daniel bedanken. Danke für dein großes Verständnis und deine immerwährende Unterstützung!