

**Lichtmikroskopische
Untersuchungen von Einflüssen
auf die Kornea unter
standardisierten Lichtbedingungen
gehaltener Masthähnchen**

von Katharina Diefert-Kammerloher

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

**Lichtmikroskopische
Untersuchungen von Einflüssen
auf die Kornea unter
standardisierten Lichtbedingungen
gehaltener Masthähnchen**

**von Katharina Diefert-Kammerloher
aus Wernigerode**

München 2024

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 T. Korbelt

Und Mitbetreuung durch:

Dr. Elisabeth Hagen

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

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

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger T. Korbelt

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Elke Rauch

Tag der Promotion: 6.Juli 2024

Für meine Familie und Manfred Bollmann

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	5
1. EINLEITUNG.....	7
2. LITERATURÜBERSICHT	9
2.1 Das Vogelauge	9
2.1.1 Anatomie und Physiologie des vorderen Augensegmentes.....	9
2.1.1.1 Augenhöhle – <i>Orbita</i>	9
2.1.1.2 Augapfel – <i>Bulbus oculi</i>	11
2.1.1.3 Die äußere Augenhaut – <i>Tunica fibrosa bulbi</i>	14
2.1.1.4 Die mittlere Augenhaut – <i>Tunica vasculosa seu media bulbi</i>	16
2.1.1.5 Linse – <i>Lens</i>	23
2.1.1.6 Augenkammern und Glaskörper – <i>Camerae et Corpus vitreum</i>	25
2.1.1.7 Muskeln des Augapfels	26

INHALTSVERZEICHNIS

2.1.1.8 Augenlider – <i>Palpebrae</i>	29
2.1.1.9 Akkomodation	32
2.2 Augenerkrankungen in der Masth�hnerhaltung .	35
2.3 Rechtliche Bedingungen zur Haltung von Masthähnchen.....	40
2.4 Lichtmikroskopie.....	42
2.4.1 Licht.....	43
2.4.1.1 Brechung, Beugung, Interferenz und Polarisierung.....	44
2.4.2 Aufbau eines Mikroskops.....	46
2.4.2.1 Objektive.....	48
2.4.2.2 Die numerische Apertur des Objektivs – Vergr�o�erung, Auflösung.....	49
2.4.2.3 Abbildungsfehler	51
2.4.2.3.1 Monochromatische Aberrationen	52
2.4.2.3.2 Chromatische Aberrationen	54
2.4.2.3.3 Korrektur der Aberration	55
2.5 Histologie.....	56
2.5.1 Fixierung.....	58

INHALTSVERZEICHNIS

2.5.1.1	Fixierungsbedingungen.....	61
2.5.2	Einbettung	65
2.5.3	Schneiden.....	67
2.5.4	Färbung	71
2.5.4.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE).....	74
2.5.4.2	Azanfärbung nach Heidenhain	76
2.5.5	Eindecken der Präparate	81
2.5.6	Artefakte	82
3.	MATERIAL UND METHODEN.....	84
3.1	Probanden.....	84
3.2	Enukleation und Fixierung	89
3.3	Entwässerung.....	95
3.4	Einbettung und Paraffinschnitte	100
3.5	Färbung und Eindecken.....	103
3.6	Lichtmikroskopie und Messungen der Kornea .	108
3.7.	Statistische Auswertung	109
4.	ERGEBNISSE	111
4.1	Lichtprogramm.....	111
4.2	Korneadurchmesser	114

4.3 Herstellung histologischer Präparate	124
4.4 Korneadicke	129
5. DISKUSSION	134
5.1 Anzahl der Tiere und Beleuchtungsprogramm .	135
5.2 Herstellung histologischer Präparate	137
5.3 Auswertung Messergebnisse hinsichtlich statistischer Auswertung und Methodik.....	144
5.4 Tierschutzrelevanz.....	147
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	150
7. SUMMARY	154
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	157
9. ANHANG.....	166
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	184
TABELLENVERZEICHNIS	187
10. DANKSAGUNG.....	190

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Aqua dest.	=	destilliertes Wasser
bit	=	binary digit (binäre Ziffer)
°C	=	Grad Celsius
D	=	Dunkel
DNA	=	Desoxyribonukleinsäure
ER	=	endoplasmatisches Retikulum
Fa.	=	Firma
ggf.	=	gegebenenfalls
h	=	Stunde/Stunden
HCl-Ethanol	=	Salzsäure-Ethanol-Lösung
Hz	=	Hertz
Koef	=	Koeffizient
KT	=	Kontrolltiergruppe
L	=	Licht
M.	=	Musculus
Mm.	=	Musculi
MW	=	Messwert

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μm	=	Mikrometer
N.	=	Nervus
n	=	Brechungsindex
NA	=	Numerische Apertur
nm	=	Nanometer
OCT	=	Optische Kohärenztomografie
OD	=	Oculus dexter
OS	=	Oculus sinister
p-Wert	=	p-Value
SE-Koeff	=	SE-Koeffizient/Standardfehler
$\sin \alpha$	=	Sinus Alpha
TierSchG	=	Tierschutzgesetz
TierSchNutzV	=	Tierschutz-
Nutztierhaltungsverordnung		
t-Wert	=	t-Value
VT	=	Versuchstiergruppe
W	=	Watt

1. EINLEITUNG

Vögel orientieren sich, von wenigen artspezifischen Unterschieden abgesehen, primär visuell (Duke-Elder, 1958). Ein vollständiger Ausgleich des Sehverlustes durch andere sensorische Fähigkeiten ist kaum oder nicht möglich. Daher unterscheidet sich das Vogelauge morphologisch hinsichtlich verschiedener Aspekte wesentlich vom Säugetierauge. Lichtintensitäten und Lichtspektren wie blau und rot werden empfindlicher und in unterschiedlicher Ausprägung im Wellenlängenbereich von 320-680 nm wahrgenommen (Korbel, 2023; Lewis and Morris, 2000), der spektrale Perzeptionsbereich ist bei fast allen Vogelarten in den Ultraviolettbereich verschoben, welcher von wesentlicher Bedeutung für eine Vielzahl vogelspezifischer Verhaltens- und Orientierungsweisen ist.

Licht spielt eine entscheidende Rolle zur Regulation des Wohlbefindens von Masthühnern. Es hat sowohl in hohen als auch niedrigen Intensitäten einen erheblichen Einfluss und kann Veränderungen im Verhalten und in der Gesundheit der Tiere hervorrufen. In der Literatur gibt es bereits zahlreiche Studien, die sich mit den unterschiedlichen Auswirkungen von Licht in der Masthähnchenhaltung beschäftigen und beschreiben. Bei einer Reduzierung der Lichtintensität wurden

1. EINLEITUNG

unter anderem Größenveränderungen der Augen bei Masthühnern nachgewiesen (Deep et al., 2010; Lauber and Kinnear, 1979; Olanrewaju et al., 2015; Rault et al., 2017). Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob die festgelegte und rein quantitativ basierte Lichtintensität von 20 Lux, welche aviäre Sehgewohnheiten weitgehend vernachlässigt und qualitative Notwendigkeiten außer Acht lässt, wie in der national geltenden Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung von 2001 (in der Fassung der Bekanntmachung vom 22.08.2006, letzten Änderung vom 29.01.2021 durch Artikel 1a) verbindlich vorgeschrieben ist, sinnvoll und haltbar ist.

Das Ziel der vorliegenden Studie ist es, zu überprüfen, ob ein diskontinuierliches Lichtprogramm mit Lichtintensitäten von weniger als 20 Lux die Entwicklung von Augenstrukturen bei Masthühnern beeinflussen kann und ob diese Veränderung mit dem Fokus auf der Korneadicke durch lichtmikroskopische Untersuchungen und als Grundlage zur Verifizierung mittels der dreidimensionalen Sonographie gewonnener Daten von Schneeganß (2018) nachweisbar sind.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Das Vogelauge

2.1.1 Anatomie und Physiologie des vorderen Augensegmentes

Vogeläugen weisen anatomisch gleiche Grundstrukturen wie das Säugetierauge auf, grenzen sich aber durch physiologische und anatomische Besonderheiten ab. Im Folgenden soll Bezug auf die unterschiedlichen Bauweisen der Strukturen des Vogelauges insbesondere des vorderen Augensegmentes genommen werden, um eine korrekte Beurteilung und Auswertung histologischer Präparate zu gewährleisten.

2.1.1.1 Augenhöhle – *Orbita*

Die Augenhöhle (*Orbita*) wird aus knöchernen Anteilen des *Os frontale*, *Os squamosum*, *Os laterosphenoidale*, *Os lacrimale* und *Os ethmoidale* gebildet (Reese et al., 2016). Dabei ist die *Orbita* bei den meisten Vogelarten nicht vollständig knöchern verschlossen. Das faszienartige *Ligamentum suborbitale* bildet bei der Mehrheit der Vogelarten den ventralen Verschluss. Beide Augenhöhlen liegen dicht aneinander und werden durch das dünne knöcherne *Septum interorbitale* getrennt (Bezzel,

2. LITERATURÜBERSICHT

1990; Martin, 1985; Reese et al., 2016; Tiedemann, 1810), welches mit Ausnahme von den meisten dämmerungsaktiven Vögeln besonders dünn bis membranös erscheint (Reese et al., 2016).

Ein bedeutender Unterschied zum Säugetierauge ist bei tagaktiven Vögeln der *Processus supraorbitalis*, der kaudolateral als ausgezogener Fortsatz das Tränenbein überragt und gleichzeitig mit dem Augapfel, der die tiefe Augenhöhle vollständig ausfüllt, einen besonderen Schutz gegen traumatische Einwirkungen besitzt. Hingegen bei dämmerungsaktiven Vögeln übernimmt ein knöcherner Skleralring (*Anulus ossicularis sclerae*) diese Schutzfunktion, da die Augenhöhle sehr flach ist (Reese et al., 2016).

Ein weiterer Unterschied zwischen Vogel- und Säugetierauge ist die Ausbildung des retrobulbären Fettkörpers. Der Augapfel des Vogels ruht auf dem *Sinus infraorbitalis* wie auf einem Luftkissen und ist nicht vollständig wie bei den Säugetieren von einem Fettkörper umschlossen (Reese et al., 2016). Der *Sinus infraorbitalis* ist beim Huhn am größten ausgebildet, dünnwandig und stellt im kaudalen Abschnitt der Nasennebenhöhle eine Verbindung dar (Frewein and Sinowatz, 2004).

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1.1.2 Augapfel – *Bulbus oculi*

Wissentlich ist der Augapfel (*Bulbus oculi*) bei allen Vögeln in Relation zur Schädelgröße und Körpergewicht sehr groß. Das Sehvermögen und die optische Auflösung auf der Retinafläche sind somit als hervorragend anzusehen (Frewein and Sinowatz, 2004). Der Anteil der Augapfel am Kopfgewicht bei Hühnern beträgt 7-8,5 %, was verglichen zum Menschen mit lediglich 1 % Gewichtsanteil deutlich höher liegt (Reese et al., 2016). Die Form des Augapfels wird bei allen Vögeln als Rotationsellipsoid beschrieben, wodurch der Äquatordurchmesser größer ist als der Längendurchmesser. Für die Spezies Huhn wurden Größen von 18-20 mm im Äquator- und 13-15 mm im Längendurchmesser bestimmt (Frewein and Sinowatz, 2004). Somit kann sich keine Kugelform ausbilden (Reese et al., 2016), denn der vordere Abschnitt (*Bulbus oculi anterior*) mit der Kornea ist stärker gekrümmt als der hintere Abschnitt (*Bulbus oculi posterior*) mit dem flachen schalenartigen *Fundus oculi* (Reese et al., 2016). Eine Verbindung dieser beiden Abschnitte wird durch den knöchernen Skleralring hergestellt.

Es lassen sich folgende Bulbusformen unterscheiden (Bezzel, 1990; Duke-Elder, 1958; Reese et al., 2016; Walls, 1942):

- flache Augapfelform (tagaktive Vögel mit einem schmalen Kopf, z.B. Tauben, Papageien)

2. LITERATURÜBERSICHT

- globuläre Augapfelform (tagaktive Vögel mit einem breiten Kopf, z.B. Taggreifvögel)
- tubuläre Augapfelform (dämmerungsaktive Vögel, z.B. Eulen)
- flachglobulärer Mischtyp (z.B. Enten)

In Abbildung 1 sind die verschiedenen Bulbusformen dargestellt.

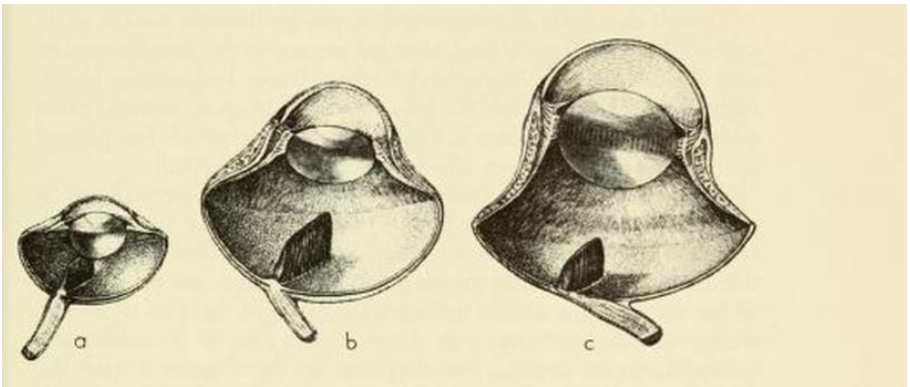


Abbildung 1: Bulbusformen (Walls, 1942)

a: flach, b: globulär, c: tubulär

2. LITERATURÜBERSICHT

Neben den unterschiedlichen Bulbusformen weist der Augapfel vieler Vogelarten eine Asymmetrie auf, da nasal ein schmalerer Ziliarkörper ausgebildet ist, wodurch das binokulare Sehen begünstigt wird (Bezzel, 1990; Duke-Elder, 1958; Korbelt, 1994; Ravelhofer, 1996; Reese et al., 2016; Seidel, 1988; Werther et al., 2011). Die laterale Anordnung der Augäpfel am Kopf beschränkt das Sichtfeld auf ein monokulares Sehfeld, kann aber von den meisten Vogelarten durch eine starke Beweglichkeit der Halswirbelsäule ausgeglichen werden (Reese et al., 2016).

Die Wand des Augapfels gleicht den Schichten der Säugetiere und baut sich folgendermaßen auf (Sinowatz, 2019):

- äußere Augenhaut (*Tunica fibrosa bulbi*)
- mittlere Augenhaut (*Tunica vasculosa bulbi, Uvea*)
- innere Augenhaut (*Tunica interna bulbi, Retina*)

Der Innenraum des Augapfels wird größtenteils vom Glaskörper (*Corpus vitreum*) ausgefüllt, welcher zusammen mit der Iris die hintere Augenkammer (*Camera posterior bulbi*) begrenzt (Sinowatz, 2019). Die vordere Augenkammer (*Camera anterior bulbi*) liegt zwischen Iris und Hornhaut (Sinowatz, 2019). Die Augenkammern sind mit Kammerwasser (*Humor aquosus*) gefüllt.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1.1.3 Die äußere Augenhaut – *Tunica fibrosa bulbi*

Die äußere Augenhaut wird von der weißen hinteren Lederhaut (*Sklera*, weiße Augenhaut) und der transparenten vorderen Hornhaut (*Cornea*) gebildet. Sie verleiht dem Augapfel Stabilität, ist widerständig gegen den Augeninnendruck und hat eine Schutzfunktion gegen äußere Einflüsse (Reese et al., 2016).

Die derbe Lederhaut besteht aus eingelagerten hyalinen Knorpelplatten, die ihre bindegewebige Struktur ausbilden und lateroventral am Augenhintergrund eine Aussparung für den Sehnerveneintritt des *Nervus opticus* aufweist (Frewein and Sinowatz, 2004). Die hyaline Knorpelplatte bildet im Übergang zur Kornea den Skleralring. Dieser besteht in der Regel aus 15 übereinanderliegenden, fischschuppenartigen Knochenblättchen (*Ossicula sclerae*) und bildet einen wichtigen Bestandteil für die mechanische Stabilität und Akkomodation des Auges (Duke-Elder, 1958).

Die transparente Hornhaut ist speziesspezifisch gekrümmt und weist eine Hornhautdicke von 0,4 mm, außer bei Wasservögeln und tagaktiven Greifvögeln auf (Frewein and Sinowatz, 2004; Martin, 1985; Reese et al., 2016).

2. LITERATURÜBERSICHT

Die Hornhaut wird in 5 Schichten aufgebaut (Frewein and Sinowatz, 2004; Reese et al., 2016):

- vorderes Hornhautepithel (*Epithelium corneae externum*) = mehrschichtiges, unverhorntes Plattenepithel
- Bowman-Membran (*Lamina limitans superficialis*) = dicke, homogene Schicht aus feinsten Kollagenfasern
- bindegewebige Eigenschicht (*Substantia propria corneae*) = Stroma, der Hauptanteil der Hornhaut, besteht aus Kollagenfaserbündeln mit chondroitinsulfathaltiger Grundsubstanz, die hohes Wasserbindungsvermögen aufweisen und für Transparenz der Hornhaut verantwortlich ist
- Descemetsche Membran (*Lamina limitans profunda*) = dünne Schicht aus kollagenen Filamenten, nicht bei allen Vogelarten ausgebildet
- hinteres Hornhautepithel (*Epithelium corneae internum*) = einschichtiges Plattenepithel, verhindert das Eindringen von Kammerwasser ins Stroma

Keine der Schichten besitzt Blutgefäße, aber dafür reichlich sensible Nervenfasern, die für die Nährstoffversorgung durch Diffusion aus dem Kammerwasser und dem präkornealen Tränenfilm sorgen (Frewein and Sinowatz, 2004; Reese et al., 2016).

2. LITERATURÜBERSICHT

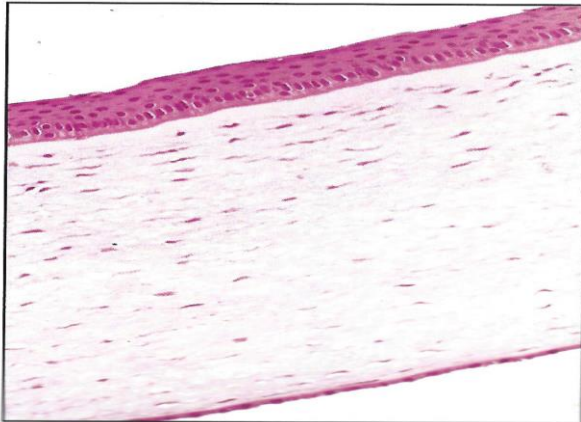


Abbildung 2: Hornhaut HE Färbung Huhn (Fletcher, 2008)

2.1.1.4 Die mittlere Augenhaut – *Tunica vasculosa seu media bulbi*

Die mittlere Augenhaut ist dreischichtig aufgebaut (Reese et al., 2016):

- Regenbogenhaut (*Iris*)
- Strahlenkörper (*Corpus ciliare*)
- Aderhaut (*Choroidea*)

Die Regenbogenhaut bildet den vordersten Abschnitt der mittleren Augenhaut und begrenzt zusammen mit der Hornhaut die vordere Augenkammer (*Camera anterior bulbi*) (Frewein

2. LITERATURÜBERSICHT

and Sinowatz, 2004). Sie entspringt als ringförmige Falte und bildet mit ihrer zentralen Kante das Sehloch (*Pupilla*), welches sich bei den meisten Vogelarten als eine runde Form ausbildet (Frewein and Sinowatz, 2004; Reese et al., 2016). Hingegen die hintere Augenkammer (*Camera posterior bulbi*) begrenzt sie zusammen mit der Linse (Frewein and Sinowatz, 2004).

Die Verbindungsstelle zwischen Regenbogenhaut und Ziliarkörper ist der sehr dünne *Margo ciliaris*, welcher sich in einem mittleren Abschnitt dicker fortsetzt und am *Margo pupillaris* als Verbindung zum Pupillenrand wieder dünner endet. Die vordere Fläche der Regenbogenhaut wird von Pigmentzellen und Fibroblasten gebildet und die hintere Fläche besteht aus zwei Epithelschichten (Frewein and Sinowatz, 2004). Man unterscheidet dabei eine oberflächliche und tiefer liegende Epithelschicht. Das Irisstroma setzt sich aus lockerem Bindegewebe zusammen, welches Pigmente enthält und *M. sphincter pupillae* sowie *M. dilatator pupillae* umschließt (Frewein and Sinowatz, 2004; Sinowatz, 2019). Die okulare Binnenmuskulatur ist im Gegensatz zum Säugetier überwiegend quergestreift und unterliegt damit einer willkürlichen Beeinflussung. Dies stellt die größte Herausforderung in der klinischen Ophthalmologie im Zusammenhang mit der Induktion einer Mydriasis zur Spiegelung des Augenhintergrundes dar. Der kräftig

2. LITERATURÜBERSICHT

ausgebildete quergestreifte *M. sphincter pupillae* ist parasympathisch innerviert und ist für die Verengung der Pupille zuständig. Die Weitstellung der Pupille reguliert der dünne sympathisch innervierte *M. dilatator pupillae* (Frewein and Sinowatz, 2004; Sinowatz, 2019). Beide Muskeln sind quergestreift, aber der *M. dilatator pupillae* zeichnet sich durch zusätzliche glatte Muskulatur am Pupillenrand aus und führen im Gegensatz zum Säugetierauge zur sehr schnellen Hell-Dunkel-Adaption (Frewein and Sinowatz, 2004; Reese et al., 2016). Neben den Pigmentzellen und dem lockeren Bindegewebe im Irisstroma finden sich Blutgefäße und Nerven (Sinowatz, 2019) sowie Fetteinlagerungen (Frewein and Sinowatz, 2004), die für die Farbgebung der Regenbogenhaut verantwortlich sind. Die Farbe ist abhängig von Alter, Rasse, Art und vereinzelt vom Geschlecht des Vogels. Beim Huhn können sich folgende Farben entwickeln (Frewein and Sinowatz, 2004):

- grau
- graugelb
- hellgelb
- goldgelb
- orangerot
- braunrot

2. LITERATURÜBERSICHT

Die unterschiedliche Ausbildung des Farbtons ist abhängig von der Menge und Farbe der vorhandenen Fetteinlagerungen. Der Pupillenrand erscheint in der Regel unscharf begrenzt, da sich dort eine pigmentfreie Zone bildet (Frewein and Sinowatz, 2004).

Der **Kammerwinkel** (*Angulus iridocornealis*) stellt sich in der vorderen Augenkammer zwischen Hornhaut und Regenbogenhaut auf (Sinowatz, 2019) und wird vom *Ligamentum pectinatum* überspannt. Der Kammerwinkel ist bei Vögeln im Vergleich zum Säugetier hoch geöffnet, was erklärt, dass Primärglaukome bei Vögeln vgl. selten bzw. überhaupt nicht diagnostizierbar sind (Korbel, 1994). Das *Ligamentum pectinatum* ist ein weitmaschiges elastisches und mit Endothel bekleidetes Fasergeflecht (Frewein and Sinowatz, 2004). Die Fontana-Räume (*Spatia anguli iridocornealis*) verbinden die Augenkammern und den Schlemmschen Kanal, welcher sich ringförmig darstellt und das Kammerwasser sammelt (Frewein and Sinowatz, 2004). Der Abfluss des Kammerwassers (*Humor aquosus*) in den Blutkreislauf wird über die Ziliarnerven gesteuert.

Der **Strahlenkörper** (*Corpus ciliare*) erscheint als ringförmige Wulst in das Augeninnere und wird von der Irisbasis (*Margo ciliaris iridis*) und Aderhaut (*Choroidea*) begrenzt (Reese et al., 2016). Peripher festigt ihn die Innenfläche des knöchernen

2. LITERATURÜBERSICHT

Skleralrings (*Anulus ossicularis sclerae*) (Frewein and Sinowatz, 2004). Die Innenfläche des Strahlenkörpers wird von zahlreichen meridional angeordneten Falten (*Plicae ciliares*) ausgekleidet, die einen hinteren, flach auslaufenden Bereich (*Pars plana, Orbiculus ciliaris*) und einen vorderen Strahlenkranz (*Pars plicata, Corona ciliaris*) ausbilden (Reese et al., 2016). Die *Plicae ciliares* werden durch ein zweischichtiges Epithel aufgebaut, wobei die untere Schicht aus hochprismatischen melaninreichen Zellen besteht und dem Ziliarkörper anliegt. Der Aufbau dieser Zellschicht gleicht dem Pigmentepithel der *Pars optica* der *Retina*. Die zweite Schicht hingegen besteht aus nichtpigmentierten hochprismatischen Epithelzellen, die in das Sinnesepithel der *Retina* übergehen und für die Kammerwasserproduktion zuständig sind (Frewein and Sinowatz, 2004). Sie weisen Ziliarfortsätze (*Processus ciliares*) auf, die im Gegensatz zum Säugetierauge die Linsenperipherie umschließen und durch ihre Spitzen eine Verschmelzung mit der Linsenkapsel hervorrufen (Reese et al., 2016), wodurch selten Linsenluxationen hervorgerufen werden (Korbel, 2001). Zusammengefasst übernimmt der Strahlenkörper folgende wichtige Aufgaben (Reese et al., 2016):

- Verankerung der Linse im Augapfel

2. LITERATURÜBERSICHT

- Änderungen der Formen von Linse und Kornea durch Muskulatur
- Bestandteil des Akkomodationsmechanismus

Der **Ziliarmuskel** (*Musculus ciliaris*) des Vogels weist eine quergestreifte Struktur auf, wohingegen bei Säugetieren eine glatte Struktur vorliegt (Frewein and Sinowatz, 2004; Sinowatz, 2019) und im Stroma des Ziliarkörpers aufliegt. Nach Reese et al. (2016) werden zwei Anteile des Muskels unterschieden:

- vorderer *M. ciliaris anterior* (Crampton - Muskel)
- hinterer *M. ciliaris posterior* (Brücke - Muskel)

Der *M. ciliaris anterior* beginnt an der Innenseite des Skleralrings und endet mit seiner Endsehne im Stroma der Kornea. Der *M. ciliaris posterior* beginnt auch an der Innenseite des Skleralrings, aber endet entgegengesetzt in der Basis des Ziliarkörpers (Reese et al., 2016). In älterer Literatur wie nach Martin (1985) wird ein zusätzlicher Anteil des Ziliarmuskels beschrieben, der als Müller-Muskel bezeichnet wird. Da er sich nicht deutlich abgrenzen lässt, wird er dem *M. ciliaris posterior* als *Fibrae radiales* zugezählt (Reese et al., 2016).

Der **Ziliarspalt** (*Sinus ciliocleralis*) spaltet den Ziliarkörper in eine innere und äußere Platte. Er stellt in Höhe der Irisbasis über den Kammerwinkel eine weit offene Verbindung zur vorderen Augenkammer her. Ein Maschenwerk aus feinen

2. LITERATURÜBERSICHT

Bindegewebssälkchen (*Reticulum trabeculare*) grenzt einzelne Zwischenräume, die sogenannten Fontana-Räume (*Spatia anguli iridocornealis*) voneinander ab, die eine Verbindungstelle zwischen den Augenkammern und dem Schlemmschen Kanal bilden. Dieser Kanal ist geflechtartig aufgebaut und wie bei den Säugetieren mit zahlreichen Venen innerhalb und außerhalb der Sklera verbunden, damit das gebildete Kammerwasser abgeleitet werden kann. (Frewein and Sinowatz, 2004; Reese et al., 2016).

Die Aderhaut (*Choroidea, Uvea*) schließt sich kaudal dem Ziliarkörper an und geht eine lockere Verbindung mit der Innenfläche der Sklera über die *Lamina suprachoroidea* ein, wogegen sie mit dem *Stratum pigmentosum* der *Retina* über die *Lamina basalis* eine feste Verbindung eingeht. Die *Lamina basalis* ist gefäßreich und dient durch Diffusion zur Ernährung der avaskulären *Retina* (Frewein and Sinowatz, 2004; Reese et al., 2016). Die meisten dämmerungsaktiven Säugetiere nutzen das ausgebildete *Tapetum lucidum choroideae* als lichtreflektierendes Feld, welches beim Vogelauge fehlt und einen weiteren Unterschied zum Säugetierauge darstellt (Reese et al., 2016). Im Gegensatz zu dämmerungsaktiven Vogelarten mit schwacher bis fehlender Pigmentierung weist die *Retina* bei tagaktiven Vogelarten eine starke Pigmentierung auf (Reese et al., 2016).

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1.1.5 Linse – *Lens*

Die Linse ist bikonvex flexibel und erscheint transparent zwischen der Iris und dem Glaskörper mit epitheliale Ursprung (Reese et al., 2016). Tagaktive Vogelarten weisen eine flache und nachtaktive sowie Wasservögel eine runde Linsenform auf (Walls, 1942). Sie wird von der Linsenkapsel (*Capsula lentis*) umgrenzt, die aus dünnen Kollagenfaserlamellen und Glykoproteinen besteht (Sinowitz, 2019). Ihre Aufgabe besteht darin eine semipermeable Barriere darzustellen, um die Diffusion von wichtigen Nährstoffen und dadurch die Versorgung der Linse zu gewährleisten und andererseits bei Linsenverletzungen eine Verbindung zum entstandenen Linseneiweiß mit dem Immunsystem zu unterbinden (Reese et al., 2016). Unterhalb der Linsenkapsel an der Linsenvorderfläche befinden sich Zellen eines einschichtigen Epithels, die sich bis zur Linsenachse ausrichten und dadurch ein weiteres Unterscheidungsmerkmal zum Säugetierauge ausbilden. Die Zellen werden in Richtung Linsenäquator länger und formen sich durch eine radiäre, sechsseitige Anordnung zur Linsenachse als Prismen aus (Reese et al., 2016). Dabei bildet sich ein Band, welches die Linse ringförmig umschließt (Evans and Martin, 1993). Dieser Ringwulst (*Pulvinus annularis lentis*) nutzt Einkerbungen, um

2. LITERATURÜBERSICHT

eine gleiche Anzahl an Ziliarfortsätzen mit sich zu verbinden und somit als Aufhängeapparat zu dienen (Bezzel, 1990; Frewein and Sinowatz, 2004). Neben den Ziliarfortsätzen fungieren die Strahlenbändchen (*Zonula ciliaris*) zusätzlich als Aufhängeapparat an dem Ringwulst, welche sich aus Zonulafasern (*Fibrae zonulares*) zusammensetzen und aus der *Pars ciliaris retinae* entstammen (Frewein and Sinowatz, 2004). Somit wird dem Ringwulst sowie basierend auf dem engen Kontakt des Ziliarkörpers und die weiche Konsistenz der Linse eine schnelle lentikuläre Akkomodation als Funktion zugeordnet (Reese et al., 2016). Zudem besitzt der Ringwulst eine nutritive Funktion, da seine Zellen in eine schmale Linsen­kammer (*Vesicula lentis*) zwischen Ringwulst und Linsenkern Flüssigkeit absondern kann (Evans and Martin, 1993; Reese et al., 2016). Der Linsenkern (*Corpus centrale lentis*) kann diese Flüssigkeit aufnehmen (Reese et al., 2016). Er ist aus konzentrischen Lagen von Linsenfasern (*Fibrae lentis*) aufgebaut und nimmt in der optischen Dichte von zentral nach peripher ab, wodurch sich der Aufbau zu anderen Vertebraten nicht unterscheidet. Dem Bestandteil Glykogen bei vielen Vogelarten wird eine optische Funktion zugeordnet, wodurch ein Depot den Brechungsindex steigern kann (Frewein and Sinowatz, 2004).

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1.1.6 Augenkammern und Glaskörper – *Camerae et Corpus vitreum*

Es werden folgende Augenkammern unterschieden:

- Vordere Augenkammer (*Camera anterior bulbi*)
- Glaskörperraum (*Camera vitrea bulbi*)
- Hintere Augenkammer (*Camera posterior bulbi*)

Die vordere und hintere Augenkammer sind dauerhaft mit Kammerwasser gefüllt, welches abhängig von der Epithelzelllage der *Pars caeca retinae* produziert wird und in die hintere Augenkammer abfließt. Von der hinteren Augenkammer kann es über die Pupille in die vordere Augenkammer zirkulieren und über den Kammerwinkel mithilfe des *Ligamentum pectinatum* in die Fontana-Räume (*Spatia anguli iridocornealis*) des Ziliarspaltes (*Sinus ciliocleralis*) abströmen. Die Zirkulation setzt sich weiter fort in den meist zweigeteilten *Plexus venosus sclerae*. Dieser befindet sich beim Vogel oberflächlicher als bei Säugetieren (Reese et al., 2016).

Hinter der Linse und dem Ziliarkörper befindet sich die Augenkammer des *Bulbus oculi*, der Glaskörperraum (*Camera vitrea bulbi*), und wird vom gallertartigen und durchsichtigen Glaskörper (*Corpus vitreum*) ausgekleidet. Die gallertartige Konsistenz basiert auf einem durchsichtigen Gel und hohem Wassergehalt mit ungefähr 99 %, sowie hydrophilen

2. LITERATURÜBERSICHT

Glykosaminoglykanen vorwiegend Hyaluronsäure, die ein Geflecht aus Kollagenfibrillen zum Stroma vitreum ausbilden (Frewein and Sinowatz, 2004; Reese et al., 2016). Die Kollagenfibrillen sind zusätzlich an der Oberfläche zu einer Glaskörpergrenzmembran (*Membrana vitrea*) verbunden, wodurch die Fixierung an der Pektenbasis, Pektenbrücke und dem Ziliarkörper gegeben ist (Reese et al., 2016). Die Aufgabe des Glaskörpers ist die Aufrechterhaltung des Augeninnendrucks, was einen ständigen Austausch von Wasser, Ionen und Nährstoffen durch Diffusion voraussetzt (Frewein and Sinowatz, 2004). Dies soll zu einer stabilen Lage der *Retina*, vor allem im Bereich der *Pars optica* führen, um Ablösungen der *Retina* vorzubeugen und den Stoffwechsel der gefäßlosen Einheit bis zur *Retina* zu unterstützen sowie schwingende Bewegungen des Augenfächers zu gewährleisten (Frewein and Sinowatz, 2004; Reese et al., 2016).

2.1.1.7 Muskeln des Augapfels

Bereits Bezzel (1990) hat Vogelaugen unbeweglicher als Säugetieraugen beschrieben, da neben den Augenmuskeln die Augenhöhle durch den Augapfel ausgefüllt wird und zusätzlich bei Eulenvögeln eine indirekte Fixierung über den Skleralring erfolgt, wodurch der periorbitale Spalt den Bewegungen kaum

2. LITERATURÜBERSICHT

Raum lässt. Speziell Eulenvögel gleichen die Bewegungseinschränkungen der extraokularen rudimentären Muskulatur durch eine sehr gute Beweglichkeit des Kopfes aus. Ein *M. retractor bulbi* entsprechend dem Säugetierauge ist beim Vogelauge nicht angelegt (Bezzel, 1990; Reese et al., 2016). Die *Mm. quadratus et pyramidalis* als morphologisches Pendant haben die Aufgabe der Bewegung des dritten Augenlides erhalten, welche durch Schlingenbildung der Ansatzsehne des *M. quadratus* nach einem „Umlenkrollen-System“ erfolgt (Korbel, 1994; Slonaker, 1918).

Die Muskeln des Augapfels sind identisch zum Säugetierauge und bestehen aus vier geraden und zwei schiefen Augenmuskeln (Reese et al., 2016):

Gerade Augenmuskeln:

- *M. rectus dorsalis*
- *M. rectus ventralis*
- *M. rectus temporalis*
- *M. rectus nasalis*

2. LITERATURÜBERSICHT

Schiefe Augenmuskeln:

- *M. obliquus dorsalis*
- *M. obliquus ventralis*

Die geraden Augenmuskeln *Mm. rectus dorsalis und rectus ventralis* sind für die horizontalen und die *Mm. rectus temporalis und rectus nasalis* für die vertikalen Bewegungen des Bulbus um die Achse zuständig (Evans and Martin, 1993; Frewein and Sinowatz, 2004). Alle geraden Muskeln haben ihren Ursprung unweit des *Foramen opticum* und ziehen ihren Namen entsprechend an der *Sclera* zum Äquator. Die Innervation des *M. rectus lateralis* erfolgt über den *N. abducens* und die übrigen drei Muskeln werden über den *N. oculomotorius* versorgt. Die schiefen Augenmuskeln dienen zur leichten Drehbewegung um die Längsachse des Bulbus. Beide finden ihren Ursprung am *Septum infraorbitale*, aber verlaufen unterschiedlich. Der *M. obliquus ventralis* kreuzt *M. rectus ventralis* und endet am Äquator. Der *M. obliquus dorsalis* verläuft kurz unter der Sehne des *M. rectus dorsal* und inseriert laterodorsal am Bulbus. Die Innervation erfolgt über den *N. trochlearis* (Frewein and Sinowatz, 2004).

2. LITERATURÜBERSICHT

a:	<i>M. quadratus</i>
b:	<i>M. pyramidalis</i>
c:	<i>M. rectus dorsalis</i>
d:	<i>M. rectus ventralis</i>
e:	<i>M. rectus lateralis</i>
f:	<i>M. rectus medialis</i>

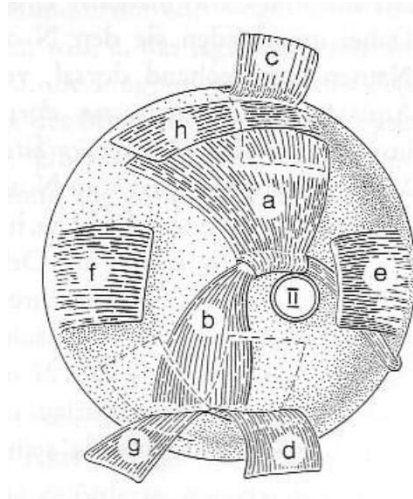


Abbildung 3: Hinterfläche eines rechten Auges mit Muskelansätzen, Huhn (Frewein and Sinowatz, 2004)

2.1.1.8 Augenlider – *Palpebrae*

Die Hauptaufgabe der drei Augenlider beinhaltet den Schutz des Augapfels besonders der Hornhaut. Zu den drei Augenlidern zählen (Frewein and Sinowatz, 2004; Reese et al., 2016):

- Oberes Augenlid (*Palpebra dorsalis seu superior*)

2. LITERATURÜBERSICHT

- Unteres Augenlid (*Palpebra ventralis seu inferior*)
- Drittes Augenlid = Nickhaut (*Palpebra tertia seu Membrana nictans*)

Das obere und untere bindegewebige Augenlid grenzen basal am Rand der Augenhöhle und umschließen die Lidspalte (*Rima palpebrarum*) (Frewein and Sinowatz, 2004). Das untere Augenlid ist bei einer Vielzahl von tagaktiven Vogelarten größer und mobiler als das obere Augenlid, um die Kornea vollständig abzudecken. Greifvogelarten besitzen zusätzlich eine knorpelige Platte (*Tarsus palpebralis*). Dagegen besitzen nachtaktive Vogelarten und Papageienvögel ein größeres und beweglicheres oberes Augenlid (Reese et al., 2016). Die Bewegungen des Lidschlusses steuert der ringförmig um die Lidspalte gelegene *M. orbicularis oculi*. Das Öffnen der Lidspalte steuern *M. levator palpebrae dorsalis seu superioris* als Heber des oberen Augenlides und *M. depressor palpebrae ventralis seu inferioris* als Niederzieher des unteren Augenlides (Frewein and Sinowatz, 2004). Die Augenliderinnenseite (*Facies conjunctivalis*) ist mit der Lidbindehaut (*Tunica conjunctiva palpebrarum*) überzogen und geht am Grund des Bindehautsackes (*Saccus conjunctivae*) in die *Tunica conjunctiva bulbi* über (Reese et al., 2016).

Der Lidrand (*Limbus palpebralis*) ist bei den meisten Vogelarten federlos. Ausnahmen wie Hühner haben schütterere und

2. LITERATURÜBERSICHT

Papageien, Greifvögel, Wasservögel sowie Strauße haben dicht besetzte Haarfedern (*Cilia palpebralia*) am Lidrand ausgebildet (Frewein and Sinowatz, 2004; Reese et al., 2016). Die Meibom-Drüsen im Lidrand des Säugetierauges sind am Vogelaugelauge nicht ausgebildet (Reese et al., 2016).

Das dritte Augenlid ist eine sehr dünne Bindehautduplikatur, die aus der Konjunktivalfalte entspringt und sich im Ruhezustand in den medialen Augenwinkel zurückzieht. Es dient als Austrocknungsschutz der Hornhaut und reguliert den präkornealen Tränenfilm. Somit nutzen Vögel im Gegensatz zum Säugetier, die durch Augenlidbewegungen und Lidschluss ihre Hornhaut befeuchten, die Bewegung des dritten Augenlides von dorsonasal in ventrotemporale Richtung (Frewein and Sinowatz, 2004; Reese et al., 2016). Es erscheint durchsichtig, außer bei Eulen weiß und bei Wasservögeln dient es zusätzlich als Schutz vor Unterwasserdruck und erhöht die Unterwassersicht (Bezzel, 1990; Reese et al., 2016). Die Bewegungen werden von *M. quadratus* und *M. pyramidalis* gesteuert. Der *M. quadratus* hat seinen Ursprung kaudodorsal am Augapfel und verläuft flach sowie breit unter dem Ende des *M. obliquus dorsalis* und *M. rectus dorsalis*. Vor seinem Ende an der dorsalen Kante des *N. opticus* bildet er mit seiner Sehne einen Bogen und entlässt eine Durchtrittsstelle für den *M. pyramidalis*. Der *M. pyramidalis* hat seinen Ursprung

2. LITERATURÜBERSICHT

ventromedial am Augapfel, verläuft weiter dorsal vom *N. opticus* durch die Durchtrittsstelle des *M. quadratus* nach ventrolateral und setzt ventral am dritten Augenlid an. Die Innervation des *M. pyramidalis* erfolgt über den *N. oculomotorius* und des *M. quadratus* über den *N. abducens* (Frewein and Sinowatz, 2004).

2.1.1.9 Akkomodation

Die Nah- und Ferneinstellungen des Vogelauges sind als konträr zum Säugetierauge anzusehen. Das Vogelauge ist in Ruhe ferngestellt und durch die Kraft von Muskelkontraktionen, die im Gegensatz zum Säuger einer quergestreiften okularen Binnenmuskulatur unterliegen und damit eine willkürliche Beeinflussung für die Nahsicht darstellen, kann das Vogelauge vor allem beim Fliegen mit schnellen Änderungen einhergehen (Bezzel, 1990).

Der Akkomodationsmechanismus des Vogelauges wird als sehr effektiv und anderen Spezies gegenüber als überlegen angesehen (Duke-Elder, 1958; Martin, 1985; Sivak et al., 1985; Walls, 1942). Die Akkomodation ist innerhalb der Vogelarten mit unterschiedlich ausgebildeten Augenformen variabel und kann in folgende Mechanismen unterschieden werden:

- Korneale Akkomodation

2. LITERATURÜBERSICHT

- Lentikuläre Akkomodation
- Retinale Akkomodation

Die korneale Akkomodation beruht auf der Kontraktion des *M. ciliaris anterior* (Cramptonscher Muskel), um eine Verstärkung der Hornhautkrümmung zu erzielen. Speziell bei nachtaktiven Vögeln ist dieser Muskel besonders stark ausgeprägt. Eulen weisen bereits im Ruhezustand eine stark gekrümmte Hornhaut und eher starke Linse auf (Reese et al., 2016; Schaeffel and Howland, 1987).

Dagegen nutzt eine andere Vogelart, wie die Wasservögel mit einer eher flachen Hornhaut und der Voraussetzung zur Nutzung ihrer Augen unter Wasser die lentikuläre Akkomodation. Denn sie sind unter Wasser auf starke Veränderungen der Brechkraft von 70 bis 80 Dioptrien angewiesen (Bezzel, 1990; Sivak et al., 1985). Die Kontraktion des *M. ciliaris posterior* (Brückescher Muskel) drückt den Ziliarkörper gegen den Ringwulst und führt zur schnellen Verformung der Linse. Zusätzlich verhindern die Zonulafasern und das *Ligamentum pectinatum* eine Verlagerung der Linse nach vorn (Reese et al., 2016). Somit kommt es insgesamt zu einer Verkleinerung des Durchmessers der Hornhaut und letztendlich zur eigenen Aufkrümmung (Schaeffel and Howland, 1987).

2. LITERATURÜBERSICHT

Bei Hühnern liegt die Akkomodationsbreite bei 15-17 Dioptrien (Schaeffel and Howland, 1987) und bildet eine Mischform aus kornealer Akkomodation von 8-9 Dioptrien (Glasser et al., 1994; Schaeffel and Howland, 1987) und aus lentikulärer Akkomodation für die restlichen Dioptrien (Glasser et al., 1995).

Die retinale Akkomodation wird durch die Rückverlagerung von choroidalen Muskelfasern der Netzhaut ausgelöst (Martin, 1985; Reese et al., 2016).

2.2 Augenerkrankungen in der Masthühnerhaltung

Bei Vögeln fungiert das Auge als wichtigstes Sinnesorgan und wird allen anderen vorangestellt. Eine vollständige Kompensation des Sehverlustes durch andere Sinnesleistungen ist nicht möglich. Spezielle ophthalmologische Untersuchungen haben ab dem 21. Jahrhundert zunehmend an Bedeutung gewonnen. Vorher versuchte man die Untersuchungstechniken für Säugetiere auf Vögel zu übertragen. Im Bereich der Nutzgeflügelhaltung wird die Ophthalmologie zunehmend mit klinischer Relevanz eingesetzt, insbesondere im Hinblick auf den Tierschutz (Bohnet, 2007). Wobei das Licht einen entscheidenden Faktor darstellt, da es einen starken Einfluss auf Verhalten und Physiologie in Bezug auf Tiergesundheit und Leistungsfähigkeit ausüben kann.

Durch vorliegende Studien können Augenveränderungen bei Hühnern unter geringerer Lichtintensität mithilfe ophthalmologischer Begriffe als Makrophthalmus, Buphthalmus, Exophthalmus und transientes Glaukom definiert werden (Frankelson et al., 1969; Harrison et al., 1968; Lauber et al., 1965; Smith et al., 1969). Mit der Wachstumsphase des Tieres und folglich der Heranreifung des Auges erreicht der

2. LITERATURÜBERSICHT

Bulbus seine maximale Elastizität, was zu einem Anstieg des Augeninnendrucks führt (Jenkins et al., 1979).

Nach Appleby et al. (1992) wird in landwirtschaftlichen Geflügelställen die Helligkeit häufig auf weniger als 10 Lux gedimmt, um die Bewegungsaktivität der Tiere zu mindern, die Futteraufnahme zu erhöhen und Energie zu sparen. Auch Weise (2007) zeigte mit der Testung von Lichtprogrammen, dass die Aufteilung und Länge der Beleuchtung mit Beleuchtungsintensitäten von bis zu 5 Lux eine entscheidende Rolle auf die Produktionsleistung im Hinblick auf Gesundheit und Wohlbefinden der Tiere spielt. Davis et al. (1999) legt dar, dass verschiedene Altersgruppen von Mast- und Legehühnerrassen unterschiedliche Vorlieben für Lichtintensitäten aufweisen. Denn 2 Wochen alte Hühnerküken präferieren Lichtintensitäten von 200 Lux während 6 Wochen alte Hühner dunklere Bereiche von ungefähr 6 Lux vorziehen und eher inaktiv waren. Widersprüchlich gegenüber diesen Studien steht die Tierschutznutztierhaltungsverordnung, welche Lichtintensitäten von 20 Lux in der Masthähnchenhaltung für alle Altersgruppen gesetzlich vorschreibt. Die Optimierung und Vereinheitlichung der idealen Lichtintensität in der Masthähnchenhaltung stellt sich durch die unterschiedlichen Vorlieben der Altersgruppen als kompliziert heraus. Die Lichtintensität hat eine hohe Relevanz auf die

2. LITERATURÜBERSICHT

Augenentwicklung und kann bei geringen Beleuchtungen größere Augendurchmesser und schwerere Augengewichte erzeugen (Blatchford et al., 2012; Rault et al., 2017) und durch die Erhöhung oder Verminderung von Lichtintensitäten in der Aufzucht können verschiedene Krankheitskomplexe am Auge ausgelöst werden. Neben dem Faktor Lichtintensität spielt der Zirkadianrhythmus eine entscheidende Rolle und wird in unterschiedlichsten Studien dargestellt (Nickla et al., 1998a, b; Nickla, 2013; Nickla et al., 2017; Nickla and Totonelly, 2016; Osol et al., 1986).

Bereits frühe Studien zeigten, dass sich die Augenäpfel von Küken, die unter gleichbleibender Lichtdauer und -intensität von Kunstlicht gehalten wurden, durch Ansammlung von Flüssigkeit vergrößern (Jensen and Matson, 1957). Weiterführende Studien bestätigten dieses Ergebnis und zeigten morphologische Veränderungen durch histologische Untersuchungen wie eine vermehrte Ansammlung von Flüssigkeit im Glaskörper, Abflachung der Hornhaut, Abnahme der gesamten Augewanddicke und der Abflachung der Netzhaut mit Reduktion der Stäbchen und Zapfen (Lauber et al., 1961). Nach Lauber (1987) wird dieser Krankheitskomplex als „light-induced avian glaucoma“ beschrieben. In weiteren Studien ist nachgewiesen, dass die vordere Augenkammer sich schwach entwickelt, aber der Augeninnendruck durch

2. LITERATURÜBERSICHT

Abflussstörungen des Kammerwassers aufgrund eines eingeeengten Kammerwinkels ansteigt (Lauber and McGinnis, 1966; Smith et al., 1969) und kann mit einem vollständigen Verlust der Sehkraft durch Verknöcherungen des Glaskörpers im Alter von 24 Monaten einhergehen (Lauber and McGinnis, 1966). Der Auslöser des Buphthalmus ist ungeklärt (Whitley et al., 1869). Es wird angenommen, dass Glukokortikoide produziert von der Nebenniere, Gonadotropin sowie Melatonin (Lauber et al., 1986) oder Schilddrüsenhormone (Lauber, 1982) die Entstehung des „light-induced avian glaucoma“ beeinflussen können. Der Begriff „Glaukom“ beschreibt einen pathologisch erhöhten Druck im Inneren des Auges (Miller, 2018) und kann infolgedessen unter anderem zu Buphthalmus, Korneaödem, abgeflachte vordere Augenkammer, Blepharospasmus, Gefäßeinsprossung, dilatierte Pupille, Linsenluxation, Funktionseinschränkungen des Sehnervs und der Netzhaut sowie Blindheit auslösen und starke Schmerzen verursachen (Miller, 2018). Lauber (1987) lässt die Frage der Zugehörigkeit zum Winkelblock- oder Offenwinkelglaukom des „light-induced avian glaucoma“ ungeklärt.

Im Gegensatz zur Helligkeit und Intensivbeleuchtung kann auch die Dunkelheit Augenveränderungen hervorrufen und den Krankheitskomplex „dim light-induced macrophthalmos“ auslösen. Er weist eine Bulbusvergrößerung, Abflachung der

2. LITERATURÜBERSICHT

Kornea und Atrophie der Augenhüllen sowie die Entstehung einer Kurzsichtigkeit auf (Blatchford et al., 2012; Jenkins et al., 1979; Olanrewaju et al., 2006; Rault et al., 2017). Zusätzlich zur gediminten Lichtintensität wurde in verschiedenen Studien die Haltung an den Zirkadian-Rhythmus angepasst und zeigten vergleichbare Ergebnisse zum Krankheitskomplex „dim light-induced macrophthalmos“, wie eine Bulbusvergrößerung aber keinen Anstieg des intraokularen Drucks oder Glaskörpervolumens sowie Veränderungen der Hornhaut ab der 6. Lebenswoche der Hühner (Harrison et al., 1968; Lauber and Kinnear, 1979; Oishi and Murakami, 1985).

Olanrewaju et al. (2015) zeigte, dass Masthähnchen gegenüber 3 verschiedenen Lichtintensitäten von 10, 5 und 0,5 Lux ab Tag 8 eine Zunahme des Augengewichtes aufweisen, aber im Verhältnis zum Körpergewicht keine Auswirkungen hat. Rault et al. (2017) zeigte in Studien mit Haltungen von Masthähnchen bei unterschiedlichen Lichtintensitäten von 5 und 20 Lux, dass die Augengewichte bei Masthähnchen mit einer Lichtintensität von 5 Lux höher waren.

Zusammenfassend legen verschiedene Studien nahe, dass Augenvergrößerungen durch eine dauerhaft zu hohe oder niedrige Beleuchtungsintensität hervorgerufen werden können, aber die Ursache der Veränderung wie bei dem Krankheitskomplex „dim light-induced macrophthalmos“ nicht

2. LITERATURÜBERSICHT

klar definiert werden kann (Chiu et al., 1975; Lauber and Kinnear, 1979).

Allgemein nach KORBEL (1994) treten Erkrankungen der Hornhaut und Sklera bei 16,9 % der Patienten mit Augenbeschwerden auf, wobei hauptsächlich Traumata und bakterielle Infektionen als Hauptursachen identifiziert werden.

2.3 Rechtliche Bedingungen zur Haltung von Masthähnchen

Der Hauptgrundsatz der gesetzlichen Vorgaben ergibt sich aus dem Tierschutzgesetz (TierSchG) von 1972 in der Neufassung von Mai 2006 mit der letzten Änderung vom 20.12.2022, insbesondere Paragraf 1, der besagt, dass es *„ohne vernünftigen Grund untersagt ist, einem Tier Schmerzen, Leiden oder Schäden zuzufügen“*. Zusätzlich liegt in der *„Verantwortung des Menschen, das Tier als Mitgeschöpf zu betrachten und sein Leben sowie Wohlbefinden zu schützen.“* Das Tierschutzgesetz Paragraf 2 regelt zusätzlich die Grundsätze der Haltung und Betreuung von Tieren, denn *„ein Tier muss seiner Art und seinen Bedürfnissen entsprechend angemessen ernährt, gepflegt und verhaltensgerecht*

2. LITERATURÜBERSICHT

unterbracht werden“, ...und man muss über erforderliche Kenntnisse und Fähigkeiten verfügen“.

Die seit 2001 geltende Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung (TierSchNutzV) in der Fassung der Bekanntmachung vom 22.08.2006 und der letzten Änderung vom 29.01.2021 konkretisiert und vertieft die Vorschriften des TierSchG, indem sie detaillierte und spezifische Bestimmungen für die Haltung von Nutztieren festlegt. Als Grundlage der Masthähnchenhaltung legt die TierSchNutzV die rechtlichen Voraussetzungen in Abschnitt 4 mit den Paragraphen 16 bis 20 fest. Sie findet Anwendung auf Masthühnerhaltungen mit einem Bestand von 500 Tieren oder mehr, sofern diese nicht gemäß den Richtlinien für extensive Bodenhaltung oder Auslaufhaltung nach Anhang V der Verordnung (EG) Nr. 543/2008 oder in ökologischer Haltung gemäß der Verordnung (EG) Nr. 834/2007 gehalten werden sowie zu einer Brüterei zählt. Spezielle gesetzliche Vorgaben zur Beleuchtung in der Haltung von Masthähnchen werden durch Paragraph 19 geregelt: *„in allen Masthühnerställen während der Lichtstunden die Lichtintensität mindestens 20 Lux, in Kopfhöhe der Tiere gemessen, beträgt, wobei mindestens 80 vom Hundert der Masthühnernutzfläche ausgeleuchtet sein müssen, und, mit Ausnahme von Masthühnerställen nach § 18 Absatz 5 Satz 2, natürliches Tageslicht einfällt“* und *„spätestens ab dem siebten Tag nach*

2. LITERATURÜBERSICHT

der Einstellung der Masthühner und bis zu drei Tagen vor dem voraussichtlichen Schlachttermin ein 24-stündiges Lichtprogramm betrieben wird, das sich am natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus orientiert und mindestens eine sechsstündige ununterbrochene Dunkelperiode gewährleistet, wobei Dämmerlichtperioden nicht berücksichtigt werden“. Die Ausnahme gemäß Paragraf 18 Absatz 5 Satz 2 TierSchNutztV betrifft die Regelung über die baulichen Gegebenheiten von Masthühnerställen, um sie mit Lichtöffnungen auszustatten, durch die natürliches Licht einfallen kann. *„Deren Gesamtfläche entspricht mindestens 3 % der Stallgrundfläche und die so angeordnet sind, dass eine möglichst gleichmäßige Verteilung des Lichts über die gesamte Stallgrundfläche gewährleistet ist“.*

Die Vorgaben für die Aufzucht von Masthähnchen sind in unterschiedlichen Gesetzen, Verordnungen, Richtlinien und Empfehlungen auf nationaler sowie bundeseinheitlicher Ebene verankert und einzuhalten.

2.4 Lichtmikroskopie

Zur richtigen Anwendung lichtmikroskopischer Verfahren und um diese interpretieren zu können bedarf es einem gewissen Verständnis einiger Grundlagen und deren Bedeutung.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.4.1 Licht

Licht bildet einen Anteil der elektromagnetischen Strahlung im Wellenlängenspektrum von 400 bis 800 nm, welche mit dem bloßen Auge wahrnehmbar sind. Die Einheit "Nanometer" wird typischerweise verwendet, um die Wellenlänge von Licht zu messen. Verschiedene Wellenlängen können bestimmten Farben zugeordnet werden, die als Spektralfarben bekannt sind. Bei einer Wellenlänge von 450 nm wird Licht als blau wahrgenommen, bei 530 nm als grün und bei 630 nm schließlich als rot (Walther and Walther, 1999). Bereiche im Infrarotspektrum mit bis zu 1200 nm und ultravioletten Spektrum bei 200 bis 380 nm werden in der Lichtmikroskopie erfasst und über geeignete Detektoren für die Bildgebung oder Analyse sichtbar gemacht.

Die Helligkeit des Lichtes ist gebunden an eine Anzahl von Photonen, die unser Auge in einem definierten Zeitraum erreicht und ist abhängig von Farben und Kontrasten. Das Optimum der empfundenen Helligkeit liegt bei grün-gelben Farbtönen im Wellenlängenbereich von 500 bis 560 nm. Das Auge kann 50 bis 60 Helligkeiten neben einer Graustufenbildung unterscheiden. Im Zeitalter der Digitalisierung sind Auflösungen an Monitoren und

2. LITERATURÜBERSICHT

Digitalkameras nicht mehr mit dem bloßen Auge vergleichbar und beweisen andere Dimensionen der Bildanalyse (Mulisch and Welsch, 2015).

2.4.1.1 Brechung, Beugung, Interferenz und Polarisation

Durch die Darstellung des Lichtes in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen und dem damit verbundenen Absorptionscharakter sollten weitere Faktoren wie Brechung, Beugung, Interferenz und Polarisation nicht außer Acht gelassen werden (Mulisch and Welsch, 2015).

Luft, Wasser oder Glas können in unterschiedlichem Ausmaß eintreffendes Licht verlangsamen. Weist das entsprechende Medium eine höhere Dichte auf als Licht und trifft es in einem bestimmten Winkel auf das Medium, kommt es nicht nur zur Verlangsamung, sondern auch zur **Brechung**. Somit tritt das Licht in einem bestimmten Winkel ein und wieder aus. Ist bei Wiederaustritt die Dichte des Mediums geringer als beim Licht, erfolgt eine umgekehrte Ablenkung und man spricht von einer parallelen Versetzung des Lichtstrahls (Mulisch and Welsch, 2015; Walther and Walther, 1999).

Bereits in der Mitte des 17. Jahrhunderts wurde dem Licht ein Wellencharakter von Francesco Maria Grimaldi und Robert Hooke durch verschiedene Versuche zuerkannt. Somit können

2. LITERATURÜBERSICHT

sich Wellen nicht geradlinig durch Hindernisse ausbreiten und die **Beugung** kann als Eigenschaft festgelegt werden. Damit einhergehend kann eine Überlagerung von Wellen zur Verstärkung oder Auslöschung von Wellenlängen führen und werden als **Interferenz** zusammengefasst (Linnemann and Kühl, 2018).

Die **Polarisation** definiert sich über die unterschiedliche Ausrichtung von Wellen durch ihre Schwingungen. Entsteht eine Reduktion von Licht in gleicher Schwingungsebene bildet sich linear-polarisiertes Licht, welches speziell von Facettenaugen der Bienen wahrgenommen werden kann und durch Polarisationsverfahren dargestellt werden (Mulisch and Welsch, 2015).

2. LITERATURÜBERSICHT

2.4.2 Aufbau eines Mikroskops

Im Allgemeinen sind Mikroskope von gleichem Aufbau, aber ihre Mechanik ist an ihre entsprechenden Einsatzgebiete angepasst.

Das Stativ bildet die tragende Grundeinheit, um mechanische und optische Teile des Mikroskops zu stabilisieren (Linnemann and Kühl, 2018; Mulisch and Welsch, 2015). Am Boden des Stativs befindet sich eine Lichtquelle, welche das Licht mittels Kollektorlinsen und durch Tageslicht- oder neutrale Graufilter vertikal umleitet. Die Leuchtfeldblende, die auf die Feldlinse folgt, begrenzt den Präparatbereich und mithilfe der Köhlerschen Beleuchtung kann die richtige Einstellung zur Auswertung erfolgen. Der Kondensor kann in einer Vielzahl von Ausführungen angefertigt sein und meistens enthält er die Aperturblende zur Einstellung des auflösungsbegrenzenden Beleuchtungswinkels. Die Mechanik des Kondensors lässt sich Höhenverstellen und in x-y-Richtung ausrichten, um die entsprechende Entfernung zum Präparat einzustellen, welches dafür auf dem Objektisch eingespannt wird. Die Kernstücke des Mikroskops sind die Objektive (Mulisch and Welsch, 2015). In der Regel ist der Objektivrevolver am Stativ befestigt, aber es gibt auch wechselbare Exemplare (Linnemann and Kühl, 2018). Für den Fall, dass keine Zwischenelemente wie z.B. Fluoreszenzaufflichteinheiten benötigt werden, setzt der

2. LITERATURÜBERSICHT

Beobachtungstubus mit Okularen an (Mulisch and Welsch, 2015). Man unterscheidet dabei ein Mon- (einäugig), Bin- (zweiäugig) und Trinokular (drei). Das Trinokular hat neben dem Binokular ein weiteres Linsensystem z.B. als Dokumentationsausgang zum Anschluss einer Kamera oder zum Zeichnen. Der Vorteil eines binokularen Systems gegenüber einem monokularen ist die Reduzierung der Anstrengung beim Mikroskopieren sowie die genaue Ausrichtung der Augenabstände, um ein komfortables Mikroskopieren zu gewährleisten (Linnemann and Kühl, 2018).

Mikroskope lassen sich nach ihrer Beobachtungsausrichtung des Stativs in unterschiedliche Typen einteilen (Linnemann and Kühl, 2018; Mulisch and Welsch, 2015):

- Aufrechte Mikroskope
- Inverse Mikroskope

Bei aufrechten Mikroskopen sind Objektive oberhalb am Objektstisch angebracht, wodurch eine Sicht von oben auf das Objektiv erzielt wird (Linnemann and Kühl, 2018; Mulisch and Welsch, 2015). Die Optimierung der Technik durch Naheinstellung von Objektiv und Kondensator zum Präparat sorgen für eine erschütterungsfreie, feste Position und Fokussierung durch Höhenverstellung. Dadurch wird eine hohe Auflösung und Bildqualität erzeugt (Mulisch and Welsch, 2015).

2. LITERATURÜBERSICHT

Hingegen haben inverse Mikroskope Objektive unterhalb des Objektisches mit einer Beleuchtung von oberhalb, um eine Sicht von unten auf die Präparate zu gewähren. Mit dem zusätzlich hohen einstellbaren Abstand der Kondensoren gestattet es unter Verwendung von größeren Zellkulturgefäßen Mikromanipulationen an Geweben oder Zellen in flüssigen Medien sowie lebende Zellen zu untersuchen. Inverse Mikroskope kommen bei fluoreszenzmikroskopischen digitalen Analysen und in der Konfokalmikroskopie zum Einsatz (Linnemann and Kühl, 2018; Mulisch and Welsch, 2015).

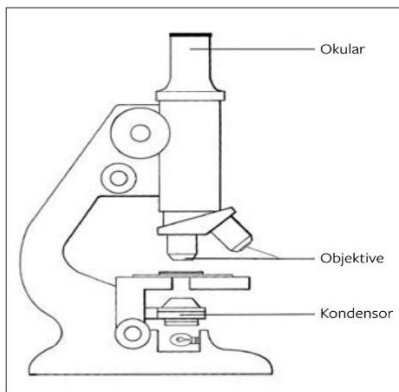


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Lichtmikroskops (Sinowatz, 2019)

2.4.2.1 Objektive

Man unterscheidet (Linnemann and Kühl, 2018):

2. LITERATURÜBERSICHT

- Objektive endlicher Bildweite
- Objektive unendlicher Bildweite

Objektive mit endlicher Bildweite lassen durch den Objekt-Zwischenbild-Abstand ein reelles und vergrößertes Zwischenbild entstehen und sind erkennbar an einer eingravierten Maßstabzahl und einer Tubuslänge von 160 bis 170 mm.

Objektive mit unendlicher Bildweite dagegen benötigen eine Tubuslinse, um den Objekt-Zwischenbild-Abstand herzustellen und um das Zwischenbild in der geeigneten Lage darzustellen (Linnemann and Kühl, 2018).

2.4.2.2 Die numerische Apertur des Objektivs – Vergrößerung, Auflösung

Die numerische Apertur abgekürzt mit NA oder A bezeichnet die Vergrößerung eines Objektivs mit ihrer Lichtaufnahmekapazität und wird über folgende Formel berechnet:

$$NA = n \times \sin \alpha$$

Somit ist sie abhängig von den Größen n = Brechungsindex des Mediums zwischen Präparat und Objektiv (bzw. Präparat und Kondensor) und $\sin \alpha$ = Sinus des halben Öffnungswinkels des Objektivs (Linnemann and Kühl, 2018).

2. LITERATURÜBERSICHT

Die Hauptaufgabe von Mikroskopen ist es Objekte vergrößert und stark detailliert darzustellen (Linnemann and Kühl, 2018; Mulisch and Welsch, 2015). Man bezeichnet diese Eigenschaft als Auflösungsvermögen, welches vereinfacht über ein ideales Objekt dargestellt wird. Es besteht aus Linien und Punkten, die über einen bestimmten messbaren Abstand definiert sind und sichtbar voneinander gelöst sind. Allerdings nutzt man zum Mikroskopieren eine Lichtquelle und verändert damit das Aussehen des Präparates. Das Objektiv nimmt das Licht über seine Öffnung bzw. den Öffnungswinkel auf. Der Öffnungswinkel ist ein kegelförmiges Strahlenbündel und je größer er ist, desto mehr Licht kann aufgenommen werden, um eine sehr gute Auflösung des Präparates zu erzielen (Linnemann and Kühl, 2018). Bisher wurde die Auflösung ohne jegliche Änderungen durch Medien wie Flüssigkeiten außer Acht gelassen. Diese Trockenobjektive weisen lediglich Luft als Medium zwischen Lichtquelle, Präparat und Objektiv auf (Mulisch and Welsch, 2015). Setzt man zusätzlich zum Mikroskopieren eine Immersionsflüssigkeit wie Öl, Wasser oder Glycerin ein, kommt es zur Brechung von Licht. Das heißt schräg einfallendes Licht wird beim Übergang in die Immersionsflüssigkeit zur Einfallsebene abgeleitet, in einen kleineren Winkel verdichtet und eine höhere Auflösung erzielt (Linnemann and Kühl, 2018).

2. LITERATURÜBERSICHT

Die endgültige Vergrößerung errechnet sich durch die Maßstabanzahl des Objektivs multipliziert mit der Vergrößerung des Okulars und die richtige Auswahl von Objektiven hängt von der Art des Einsatzes und folgenden Eigenschaften ab (Mulisch and Welsch, 2015):

- Farbkorrektur
- Bildebenheit
- Schärfentiefe
- Auflösung
- Arbeitsabstand
- Deckglaskorrektur
- Sehfeldanzahl
- Eignung für Kontrastmethoden
- Transmissionsleistung
- Autofluoreszenz
- Einsatz von Immersionsmedien

2.4.2.3 Abbildungsfehler

Bisher wurde die Funktionsweise eines Mikroskops fehlerfrei beschrieben, aber auch in diesem Bereich kommt es zu Abbildungsfehlern den sogenannten Aberrationen. Diese sind einteilbar in monochromatische und chromatische Aberrationen.

2. LITERATURÜBERSICHT

Monochromatische Aberrationen treten bei der Darstellung des Lichts von nur einer Wellenlänge auf.

Chromatische Aberrationen werden durch den Brechungsindex eines Mediums erzeugt, welcher für die verschiedenen Wellenlängen unterschiedlich ausgeprägt und die spektralen Bestandteile des Lichts fehlerhaft zerlegt (Linnemann and Kühl, 2018).

2.4.2.3.1 Monochromatische Aberrationen

Als monochromatische Aberrationen können auftreten (Linnemann and Kühl, 2018):

- Sphärische Aberrationen
- Koma
- Astigmatismus
- Bildfeldwölbung
- Verzeichnung/ Verzerrung/ Distorsion

Sphärische Aberrationen (Öffnungsfehler) bewirken ein unscharfes Bild, da nicht alle Lichtstrahlen in einem Punkt gebündelt werden, wenn sie parallel zur optischen Achse auf die Linse treffen, sondern achsenferne Lichtstrahlen absorbiert werden.

Durch den Einfall senkrechter Lichtstrahlen und der unterschiedlichen Brechkraft der Linse entstehen außerhalb der

2. LITERATURÜBERSICHT

optischen Achse senkrechte Striche und daraus resultierend ein unscharfes Bild, was als **Astigmatismus** bezeichnet wird.

Koma ist ein Asymmetriefehler, bei dem schief zur optischen Achse einfallende Lichtstrahlbündel überlagert werden und nicht rotationssymmetrisch zur optischen Achse dargestellt werden. Anstelle einer Beugung des Bildpunktes entsteht ein Schweif am Rande des Bildes.

Bei der **Bildfeldwölbung** werden Punkte nicht auf einer Ebene projiziert, sondern um die Rotationsfläche der Linsenachse, wodurch entweder das Zentrum des sichtbaren Bildbereiches oder der Randbereich scharf abgebildet wird. Somit ist nicht das gesamte Bild scharf einstellbar.

Distorsion (Verzeichnung oder Verzerrung) entsteht durch die Abstandsänderung der optischen Achse zum Bildpunkt. Das heißt, dass gerade Lichtstrahlenbündel nicht durch die optische Achse geschnitten werden und den Bildpunkt verzerrt darstellen (Linnemann and Kühl, 2018; Mulisch and Welsch, 2015).

2. LITERATURÜBERSICHT

2.4.2.3.2 Chromatische Aberrationen

Nach LINNEMANN et al. (2018) zählen zu den chromatischen Aberrationen:

- Farblängsfehler
- Farbvergrößerungsfehler

Farblängsfehler werden als axiale chromatische Aberration bezeichnet. Weißes Licht wird durch eine Sammellinse gespalten, aber es entsteht keine einheitliche Fokussierung von Wellenlängen, sondern es werden unterschiedliche Brennpunkte gesetzt. Kurze Wellenlängen wie blau liegen näher an der Linse als längere Wellenlängen wie rot und grün und werden daher stärker gespalten (Linnemann and Kühl, 2018; Mulisch and Welsch, 2015). Daraus resultiert eine Verteilung der Brennpunkte längs der optischen Achse (Linnemann and Kühl, 2018).

Die unterschiedlichen Brennweiten also Brechungen der Wellenlängen führen zu einer veränderten Größendarstellung vor und hinter der Fokusebene von Bildern. Bei Farbvergrößerungsfehlern sind Bilder kontrastarm, unscharf und von Farbsäumen umgeben (Linnemann and Kühl, 2018).

2. LITERATURÜBERSICHT

2.4.2.3.3 Korrektur der Aberration

Um diese Fehler korrigieren zu können sind alle Objektive achromatisch eingestellt. So wird gewährleistet, dass blaues und rotes Licht in einen gemeinsamen Mittelpunkt stehen (Mulisch and Welsch, 2015). Dazu werden eine Sammel- und Zerstreulinse kombiniert. Alle anderen Farben sind damit noch nicht korrigiert (Linnemann and Kühl, 2018). Eine höhere Korrekturstufe bilden die Fluoritobjektive, welche wie die Achromate zwei Wellenlängen korrigieren können. Aber durch die höhere Permeabilität für Licht entsteht ein helleres und kontrastreicheres Bild. Ihr Einsatz gilt daher vorwiegend der Fluoreszenzmikroskopie. Die höchste Korrekturstufe basiert auf den apochromatischen Objektiven, welche drei Wellenlängen im Bereich von 450, 550 und 650 nm korrigieren können. Damit entstehen Bilder mit hoher Auflösung, ausdrucksvollen Farben und Bildschärfe (Linnemann and Kühl, 2018).

2.5 Histologie

Um Präparate für die Lichtmikroskopie herzustellen, ist ein Verständnis der Grundlagen und Prinzipien histologischer Techniken erforderlich. Die Arbeit erfolgt gemäß den folgenden Schritten (Sinowatz, 2019):

- Fixierung
- Einbetten
- Schneiden
- Färben
- Einschließen zum histologischen Präparat

2. LITERATURÜBERSICHT

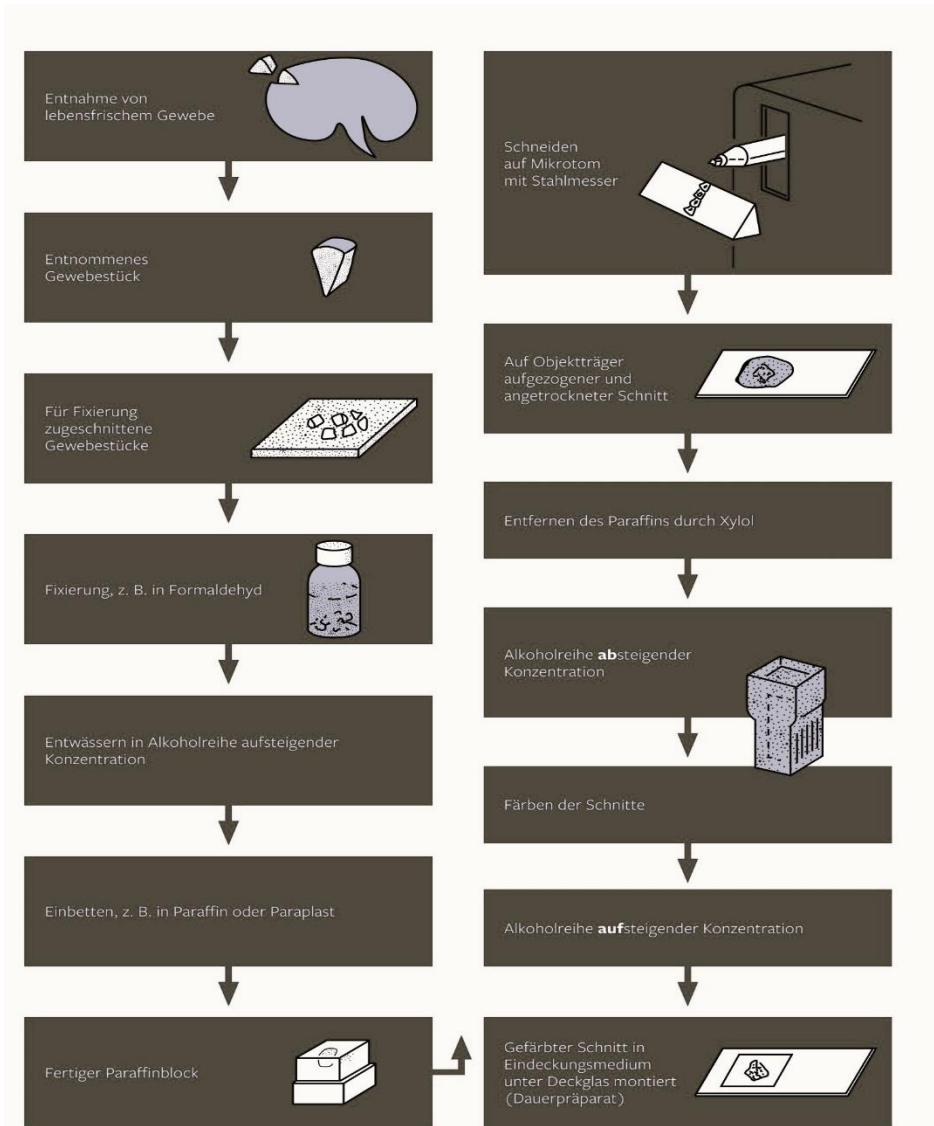


Abbildung 5: Grundlagen zur histologischen Technik (Sinowatz, 2019)

2. LITERATURÜBERSICHT

2.5.1 Fixierung

Nach der Gewinnung des zu untersuchenden Materials muss durch die Fixierung eine Haltbarkeit erzielt werden, um eine Autolyse zu verhindern und Zellstrukturen bestmöglich zu erhalten. Zudem werden Bakterien und Mikroorganismen eliminiert, sowie eine gewisse Härte des Materials erzielt, um es schneidbar zu machen (Sinowatz, 2019; Welsch and Deller, 2010). Es werden physikalische und chemische Fixierungen unterschieden (Mulisch and Welsch, 2015).

Physikalische Fixierungen:

- Trocknung
- Hitzefixierung
- Behandlung in der Mikrowelle
- Gefrierfixierung

Chemische Fixierungen:

- Immersionsfixierung
- Injektion von Fixanzien
- Auftropfen von Fixanzien
- Perfusionsfixierung

Die physikalischen Fixierungen werden an dieser Stelle nur zur Vollständigkeit benannt und nicht näher beschrieben, da sie für die vorliegende Studie allein nicht geeignet und relevant waren.

2. LITERATURÜBERSICHT

Das Prinzip der chemischen Fixierung nach Mulisch and Welsch (2015) basiert auf Wechselwirkungen der eingesetzten chemischen Substanzen mit den Bestandteilen von Zellen und Geweben. Bei der **Immersionsfixierung** wird das zu untersuchende Material in die Fixierlösung eingetaucht, wodurch sie von außen nach innen eintritt. Allerdings kann es zum Ausschwemmen, Vernetzen oder Wandern der Substanzen kommen und damit einhergehende Strukturveränderungen bzw. Artefakte wie Quellung, Schrumpfung und Substanzverlust hervorrufen. Daher ist hierbei besonders auf die Zusammensetzung und die ausreichende Menge der Fixantien zu achten.

Einen besseren Effekt der gleichmäßigen Verteilung der Fixantien bietet die **Injektion** ins Innere. Die Fixantien werden eisgekühlt mit einer entsprechenden Kanüle langsam ins Gewebe injiziert und sickern ab. Vorteilhaft ist die durchführbare in situ Injektion eines Organs. Dafür wird das Organ im betäubten Zustand freigelegt und die eisgekühlten Fixantien mittig oder in Arterien injiziert, nach 5 bis 20 min entnommen und ins Fixans zur Immersionsfixierung eingelegt.

Eine weitere in situ Methode ist das **Auftropfen** von Fixantien. Vorteilhaft dabei ist, dass Organe bereits vor der Entnahme durch die Fixantien gut beurteilbar bleiben und durch

2. LITERATURÜBERSICHT

Immersionsfixierung nach der Entnahme nachbehandelt werden können.

Die **Perfusionsfixierung** wird im narkotisierten Zustand genutzt, wodurch das Fixans direkt in die Gefäße injiziert und in die Zielorgane transportiert wird. Allerdings stellt sich die Anwendung durch eine Isolierung von Körperhälften schwierig dar und wird selten genutzt.

Die chemischen Zusammensetzungen der Fixantien können sich unterschiedlich auf Zellen und Gewebe auswirken, weshalb Fixationsgemische aus mehreren Komponenten eingesetzt werden. Einerseits basiert der Fixiervorgang mit den häufig verwendeten Fixierungsmitteln wie Formaldehyd und Glutaraldehyd auf der **Fällung von Eiweißen**, wobei Quervernetzungen zwischen Eiweißmolekülen entstehen. Sie sind starke Vernetzer. Aus einer guten Fixierung resultieren Äquivalenzbilder zum ursprünglichen Material mit Übereinstimmungen zur lebenden Zelle. Zusätzlich entsteht eine fest-elastische Konsistenz für die Schneidbarkeit (Sinowatz, 2019). Stark konzentrierte Lösungsmittel oder Salze erzeugen eine **Koagulationsreaktion**, indem sie das Zytoplasma aus der Hydrathülle der Moleküle ausfällen. Diese Reaktion führt zu einem Strukturverlust, aber guter Antigenität und Anfärbbarkeit. Im Gegensatz dazu erhalten basische

2. LITERATURÜBERSICHT

Fixantien Mitochondrien und deren Struktur (Mulisch and Welsch, 2015).

2.5.1.1 Fixierungsbedingungen

Zur Vorbeugung von Veränderungen durch Autolyse, Schwellungen oder Schrumpfungen während der Fixation muss gewährleistet werden, dass Fixantien möglichst schnell in das zu untersuchende Material eintreten und stabilisierend wirken (Mulisch and Welsch, 2015). Bei einer Fixierung von Augen ist es unerlässlich sämtliches anhaftendes Gewebe wie Muskulatur zu entfernen, um Schrumpfungen vorzubeugen (Ravelhofer, 1996; Saunders and Rubin, 1975; Werther et al., 2011). Dabei ist unbedingt auf die chemischen Eigenschaften der Fixantien zu achten, denn wasserfreie Fixantien benötigen länger um Gewebe zu durchdringen als wasserhaltige. Positiv kann sich eine Temperaturveränderung, Änderung der Druckverhältnisse oder die Nutzung von Fixierungsgemischen auf die Penetration der Fixantien auswirken. Ein entscheidender Einflussfaktor zur vollständigen Penetration des Fixans ist die Größe des Präparates. Empfohlen werden möglichst dünne Gewebescheiben. Somit sollten die Fixantien in ausreichender Menge eingesetzt werden, welches mindestens das Zwanzigfache des Präparatvolumens betragen

2. LITERATURÜBERSICHT

sollte. Gute Erfolge erzielt man bei kurzen Fixierungszeiten mit schnell verteilenden Fixantien, denn bei lang andauernden Fixierungen können Strukturveränderungen entstehen, die die Präparate zu stark aushärten und brüchig werden lassen. Eine Erhöhung der Temperatur begünstigt eine schnellere Verteilung der Fixantien, aber gleichzeitig die Autolyse. Fixierungen unter Raumtemperatur sind daher ausreichend (Mulisch and Welsch, 2015).

Um Artefakte wie Schrumpfung oder Schwellung des zu untersuchenden Materials zu reduzieren, kann eine isoosmotische Fixierlösung genutzt werden. Voraussetzung dafür ist es die Osmolarität des Präparats zu kennen und das entsprechende Fixans mit einer wirkenden Pufferlösung einzusetzen, um das natürliche Verhältnis der Ionenkonzentration des zu untersuchenden Materials aufrecht zu erhalten. Die Fixierungsreaktionen sind am effektivsten bei einem pH-Wert von 7, da dieser bei vielen Zelltypen im Zytoplasma vorherrscht (Mulisch and Welsch, 2015).

Nach Saunders and Jubb (1961) weist das Auge aufgrund seiner unterschiedlichen Gewebearten unterschiedliche Diffusions- und Durchdringungseigenschaften auf. Die Wahl der Fixationsmethode hängt aus diesem Grund von der zu untersuchenden Struktur ab. Die Fixation des gesamten Augapfels für histologische Untersuchungen wird ebenfalls

2. LITERATURÜBERSICHT

beschrieben (Mickay et al., 2009). Hinsichtlich des rigiden Skleralringes am Vogelaugelauge kann es während der Fixierung zu einem Flüssigkeitsverlust im Auge kommen. Es kommt folglich zu einem Einsinken der Hornhaut und Einziehungen im hinteren Augensegment, die wiederum zu artifiziellen Netzhautablösungen führen können. Diesem Phänomen wird durch eine Injektion des Fixans in die vordere Augenkammer durch den *Limbus corneae*, der sogenannten Parazentese, entgegengewirkt. Auf diese Weise wird das Kollabieren während der Fixierung verhindert, da der Flüssigkeitsverlust während des Schrumpfungsprozesses dadurch ausgeglichen wird. Das Gewebe verhärtet aufgrund der Fixierung, wodurch die Parazentese in die vordere Augenkammer mit Fixans nur innerhalb eines engen Zeitrahmens nach der Entfernung des Auges und der Platzierung in das Fixativ möglich ist (Korbel, 1994; Werther et al., 2011).

Formalin ist eines der am häufigsten verwendeten Fixantien in der histologischen Untersuchung. Dank seiner Eigenschaften kann es Formen, Farben und Strukturen sehr gut konservieren und sogar dicke Gewebestrukturen durchdringen, ohne die Anfärbbarkeit der Gewebe auch nach längerer Fixierungszeit zu beeinträchtigen (Mulisch and Welsch, 2015). Zur Fixierung von Augenstrukturen sind weitere Fixantien beschrieben, die Vorteile gegenüber einer Formalinfixierung aufzeigen.

2. LITERATURÜBERSICHT

Saunders and Jubb (1961) lehnen die Verwendung von Formalin zur Fixation von Augen ab und bevorzugen die Zenker Fixierlösung mit Essigsäure. Werther et al. (2011) stellte fest, dass längere Fixierungszeiten mit Formalin zu einer Volumenzunahme der Augen und zu Retinaablösungen führen können. Glutaraldehyd wird von Yanoff et al. (1965) als besseres Fixans gegenüber Formalin für Augen beschrieben, da es zu einer besseren Morphologieerhaltung vor allem im Bereich der Retina beitrug. Die Davidson-Lösung übertrifft Formalin hinsichtlich der Morphologieerhaltung, wodurch Zellschichten scharf begrenzt voneinander dargestellt werden können (Latendresse et al., 2002; Mickay et al., 2009). Nachteilig ist jedoch eine schlechtere Schneidbarkeit und Haftung an Objektträgern durch den hohen Alkoholgehalt der Davidson-Lösung (Childow et al., 2011).

Zusammenfassend sind folgende Faktoren entscheidend für eine gute Fixation (Mulisch and Welsch, 2015):

- Präparatgröße und Penetration
- Menge und Konzentration Fixans
- Dauer und Temperatur der Fixierung
- Osmolarität und Ionenzusammensetzung
- pH-Wert, Puffer und Pufferzusätze

2. LITERATURÜBERSICHT

2.5.2 Einbettung

Das Einbetten ermöglicht eine gleichmäßige Festigkeit des Präparates, um histologische Schnitte in Serie anzufertigen (Welsch and Deller, 2010).

Zur Vorbereitung müssen die Präparate auf eine entsprechende Größe von 5 mm Dicke, 20 mm Länge und 15 mm Breite zugeschnitten werden, um in mit Bleistift beschriftete und somit genau zuordbare Einbettkapseln überführt zu werden (Mulisch and Welsch, 2015). Danach folgt die Entwässerung bzw. das Auswaschen der Fixationslösung in einer schrittweise zunehmenden Alkoholreihe, um Artefakte zu vermeiden (Sinowatz, 2019; Welsch and Deller, 2010). Die Zeitabschnitte in der jeweiligen Alkohollösung von 50, 70, 80, 96 und 100 % sind abhängig von der Präparatdicke und kann 2 bis 4 Stunden betragen. Heutzutage erfolgt die Entwässerung automatisch in einem Einbettautomat. In dieser Entwicklungsstufe der Präparatherstellung kann es zu enormen Schrumpfungen von 8 bis 20 % des Volumens kommen und längeres Verweilen in hoch konzentriertem Alkohol führt zu stärkerer Aushärtung, wodurch das Präparat spröde wird und sich die Schnittfestigkeit erhöht.

Vor der endgültigen Einbettung muss ein Intermedium wie Xylol, Isopropanol, Aceton oder Chloroform den Alkohol

2. LITERATURÜBERSICHT

vollständig aus dem Präparat spülen und als Lösungsmittel für das Einbettmedium fungieren. Beim Umgang mit diesen organischen Lösungsmitteln ist auf Toxizität, Kanzerogenität und Gesundheitsschädigungen zu achten. Um Hohlräume zu schließen und den Eintritt des Einbettmediums ins Gewebe zu gewährleisten muss vor dem Ausgießen dieser Zwischenschritt erfolgen (Mulisch and Welsch, 2015). Als häufigstes Einbettmedium nutzt man Paraffin, welches auf 60 °C erhitzt wird und in flüssiger Form das Präparat umschließt und in einem Block ausgegossen wird (Sinowatz, 2019). Förmchen aus Metall oder Kunststoff sowie L-förmige Metallwinkel in unterschiedlichen Größen dienen als Hilfsmittel zum manuellen Ausgießen oder durch eine Ausgießstation. Zuerst füllt man das Förmchen mit ein wenig Paraffin und setzt das Präparat nach Eröffnen der Einbettkassette ein. Die Einbettkassetten sind an die Größe der Förmchen angepasst und können gleichzeitig zum Aufblocken und als Spannrahmen für das Mikrotom genutzt werden, daher werden sie aufgelegt und bis zur Oberkante mit Paraffin gefüllt. Anschließend werden sie zum Aushärten auf eine Kühlplatte gelegt und können nach ca. 15 min. in fester Form ausgelöst werden. Die Förmchen sind wiederverwendbar nach der Reinigung mit heißem Wasser. Neben Paraffin können auch Kunststoff oder Celloidinlösungen zur Einbettung genutzt werden (Mulisch and Welsch, 2015).

2. LITERATURÜBERSICHT

Eine Alternative ist die Kryomikroskopie, wodurch frische Organe mit flüssigem Stickstoff eingebettet werden können. Der Vorteil gegenüber Paraffineinbettung ist, dass keine Lösungsmittel eingesetzt werden müssen. Daher findet kein Wasserentzug im Präparat statt und eine Gewebeschrumpfung kann vermieden werden (Welsch and Deller, 2010). Sie wird speziell eingesetzt im Bereich für histochemische Verfahren wie Lipid- oder Enzymnachweise, sodass sie als Schnellschnittmethode intraoperativ zum Einsatz kommt zur Entscheidung für ein weiteres Vorgehen bei einem benignen oder malignen Zustand (Sinowatz, 2019).

2.5.3 Schneiden

Paraffinschnitte werden mithilfe von Mikrotomen angefertigt. Mikrotome können präzise gleichmäßige histologische Schnitte anfertigen (Sinowatz, 2019).

Es werden folgende Mikrotomtypen nach Mulisch and Welsch (2015) unterschieden:

- Schlittenmikrotom
- Grundschlittenmikrotom
- Rotationsmikrotom
- Gefriermikrotom (Kryostat)

2. LITERATURÜBERSICHT

- Spezialmikrotome (Groß- und Hartschlittenmikrotom, Sägemikrotom, Ultramikrotom, Vibratom)

Messer und Präparat werden zur Schnitthanfertigung am Mikrotom befestigt und je nach Modellart wird entweder das Präparat oder das Messer bewegt. Somit unterscheidet man in den Funktionsweisen zwischen Objektvorschub (vom Objekt zum Messer) und Messervorschub (vom Messer zum Objekt) zur Einstellung der verschiedenen Schnittdicken. Schlittenmikrotome funktionieren nach dem Prinzip Messervorschub und Rotationmikrotome nach dem Prinzip Objektvorschub. Das Grundschlittenmikrotom besitzt die Besonderheit einer massiven Stabilität, um größere und härtere Präparate mit dem Messervorschub zu schneiden. Für größere Abstände zwischen Objekt und Messer nutzt man den Grobvorschub. Spezialmikrotome wie die Groß- und Hartschnittmikrotome werden für komplett eingebettete Organe und Hartgewebe genutzt. Sie werden durch unterschiedliche Messer- und Probehalterungen ausgezeichnet. Sägemikrotome kommen zum Einsatz, wenn andere Mikrotome spröde und harte Präparate nicht schneiden können. Sie sind ausgestattet mit einer horizontal rotierenden Innenlochsäge und können durch die Rotationsgeschwindigkeit von 600 Umdrehungen pro Minute Schnitte mit einer Dicke zwischen 30 und 50 μm erzeugen. Aber gleichzeitig kommt es zu Materialverlust und

2. LITERATURÜBERSICHT

Serienschnitte sind ausgeschlossen. Die mechanische Schnittbewegung des Mikrotoms kann manuell oder automatisch gesteuert werden. Histologische Schnittstärken liegen zwischen 1 bis 10 μm , Semidünnschnitte bei 0,25 bis 1 μm und Ultradünnschnitte 50 bis 150 nm.

Mikrotome bestehen aus 3 Hauptkomponenten:

- Mikrotomkörper bildet das stabile Konstrukt
- Objektteil dient zur Halterung der Blöcke
- Objekthalterung dient zur Ausrichtung der Blöcke zum Messer in zwei Ebenen

Die Anschnittebene kann zwischen Messer und Präparat waagrecht oder senkrecht angeordnet sein (Mulisch and Welsch, 2015).

In der folgenden Abbildung 6 werden verschiedene Probleme mit Ursachen und eventueller Abhilfe beim Schneidevorgang der Präparate dargestellt:

2. LITERATURÜBERSICHT

Problem	Ursache	Abhilfe
Schnitt spaltet sich	Messerscharfe; kalkharte Stelle im Gewebe	Messer verschieben; am Block entkalken
Schnitt ist streifig	schartiges Messer	Messer verschieben oder Messer wechseln
Messer „springt“, Querrillen im Block (<i>shatter</i>)	zu hartes Material; Neigungs-(Anstell-)Winkel des Messers zu steil	am Block entkalken; d-Messer benutzen; Neigungs-(Anstell-)Winkel flacher einstellen
abwechselnd dicke und dünne Schnitte, auch Rattermarken im Schnitt und auf dem Block	ungenügende Klemmung an Objekt- und/oder Messerhalter	alle Schraub- und Klemmverbindungen am Objekt- und Messerhalter überprüfen und nachziehen
kein Schnitt oder nur jeder 2. Schnitt kommt	Neigungs-(Anstell-)Winkel des Messers zu flach; zu geringe μm -Einstellung	Neigungs-(Anstell-)Winkel steiler stellen; Schnittdicke erhöhen
Schnitt wird stark gestaucht bzw. zusammengeschoben	Paraffinblock zu warm; Messer zu stumpf	Paraffinblock kühlen; Messer verschieben oder neues Messer
Schnitt rollt sich auf	zu dicke Schnitte; zu hohe μm -Einstellung; Block zu warm	Schnittdicke verringern; Block kühlen
Schnittdicke entspricht nicht der eingestellten μm -Einstellung	Paraffinblock hat sich in der Wärme ausgedehnt	Block kühlen
Paraffin bröckelt, splittert	Paraffin zu langsam gekühlt; Block zu kalt; Messerswinkel zu steil	Block einschmelzen und neu ausgießen; Block anhauchen oder mit Finger erwärmen; Messerswinkel flacher stellen
Gewebe splittert	Block zu kalt	Block anhauchen oder mit Finger erwärmen
Schnitt klebt am Messer	Schnitte sind elektrostatisch auf- geladen; Messer ist mit Fett verunreinigt	Anschnittfläche des Paraffinblocks vor jedem Schnitt anhauchen oder Messer- schneide mit einem Wassertropfen bedec- ken; Messer vorsichtig! reinigen
Gewebe löst sich aus dem Paraffin	Gewebe war beim Ausgießen zu kalt; Gewebe ist noch alkoholhaltig	Block einschmelzen und neu ausgießen; Evtl. Gewebe nochmals zurückführen – Schaden lässt sich nur teilweise beheben
Gewebe bröckelt, bröselt oder lässt sich gar nicht schneiden	Gewebe ist schlecht mit Paraffin durchtränkt	Block einschmelzen und Gewebe noch mal mit Paraffin durchtränken
Gewebe ist hart und spröde und daher schlecht oder gar nicht schneidbar	bei der Entwässerung zu lange im Alkohol hoher Konzentration, und/oder zu lange im Xylol	irreparabel
Schnittfläche rissig, milchig weiß; Gewebe schiebt sich zusammen, Paraffin nicht	Gewebe nicht genügend entwässert, nicht genügend mit Paraffin durch- tränkt	Block einschmelzen und neu ausgießen; Evtl. Gewebe nochmals zurückführen – Schaden lässt sich nur teilweise beheben; Block einschmelzen und Gewebe noch mal mit Paraffin durchtränken
schmierige, unschneidbare Stellen im Paraffinblock	Gewebe ist noch intermediumhaltig, schlechte Paraffindurchtränkung	Block einschmelzen und Gewebe noch mal mit Paraffin durchtränken
Niederschläge im Präparat	Fixierung mit Sublimat, Formol und Chromat	Entfernen der Niederschläge (Kap. 3.5.2.4)
schlechte Strukturhaltung im Prä- parat	ungenügende Fixierung (z. B. zu spät, zu kurz)	irreparabel

Abbildung 6: Probleme und Artefakte bei der Schnittpräparation und ihre Abhilfe (Mulisch and Welsch, 2015)

2. LITERATURÜBERSICHT

2.5.4 Färbung

Mittels der Färbung können Zell- und Gewebselemente tendenziell Farbstoffe unterschiedlich aufnehmen und zur Unterscheidung besser dargestellt werden (Welsch and Deller, 2010). Routinemäßig werden in der Histologie Färbungen mit einem sauren und einem basischen Anteil eingesetzt, um eine azidophile, eosinophile oder basophile Reaktion mit den Zell- und Gewebselementen zu gewährleisten (Sinowatz, 2019). Kationische (basische) Komponenten der Zell- und Gewebselemente reagieren mit anionischen (sauren) Komponenten der Farbstoffe und sind daher azidophil. Basophil beschreibt die umgekehrte Reaktion, wodurch anionische Komponenten der Zell- und Gewebselemente mit kationischen Komponenten der Farbstoffe reagieren. Die spezielle Anfärbung der Zellkerne nennt man eosinophil und wird ebenfalls durch einen basischen Farbstoff hervorgerufen (Sinowatz, 2019; Welsch and Deller, 2010). Zusätzlich kann durch Metachromasie ein anderer Farbton im Gewebe entstehen als der eingesetzte Farbstoff vorgibt, denn das Vorliegen einer Vielzahl von sauren Gruppen in organischen Molekülen ist die Voraussetzung dafür (Sinowatz, 2019).

2. LITERATURÜBERSICHT

Beeinflussende Faktoren zur Anfertigung einer aussagekräftigen Färbung sind die Färbezeit, Konzentration der Farbstofflösung, Färbetemperatur, Schnittdicke, Größe des Präparats und Art der eingesetzten Fixierung. Vorausgesetzt dafür ist eine korrekte Behandlung der Schnitte vor und nach der Färbung. Die Grundlage dafür bilden die Objektträger, an welchen die Schnitte der Präparate haften und die Haltbarkeit zur Auswertung gewährleisten. Die Objektträger müssen eine gewisse Qualität aufweisen und daher in einem sauberen Zustand eingesetzt werden. In der Regel sind sie staubgeschützt verpackt, in einer genormten Größe von 76 x 26 mm und Dicke von 1 bis 1,2 mm sowie mit geschliffenen oder ungeschliffenen Kanten verfügbar. Zur Beschriftung und Zuordbarkeit des Präparates dient ein mattierter Rand am Objektträger. Falls es doch zu Verunreinigungen kommt, dient Aceton oder ein anderer Alkohol als Reinigungsmittel, welches nach dem Einlegen mit einem fusselfreien Tuch abgewischt wird (Mulisch and Welsch, 2015).

Nach der Überprüfung der korrekten Qualität des Objektträgers können die angefertigten Paraffinschnitte aufgezogen werden. Die Schnitte werden in ein 35 bis 40 °C erwärmtes Wasserbad aus Aqua dest. überführt, wo sie auf der Oberfläche schwimmen. Zum Aufziehen taucht man den Objektträger schräg unter den Schnitt ein und hebt ihn hoch. Zur Hilfe kann

2. LITERATURÜBERSICHT

man einen Pinsel oder eine Präpariernadel nutzen. Nach dem Aufziehen müssen die Schnitte im Wärmeschrank bei 60 °C für mindestens 20 min. getrocknet werden. Soll durch die Färbung ein Antigen oder Enzym nachgewiesen werden, kann die Trocknung auch über Nacht bei 40 °C erfolgen (Mulisch and Welsch, 2015).

Im Gegensatz dazu wird bei Gefrierschnitten der Objektträger parallel zum Messer angelegt und der Schnitt durch anschmelzen aufgezogen. Dabei ist darauf zu achten, dass kein Gewebe am Messer kleben bleibt, ansonsten muss Aceton zur Reinigung genutzt werden. Die Trocknung ist identisch zu den Paraffinschnitten. Nach der Trocknung können die Schnitte in die Farblösungen überführt werden. Bei Paraffinschnitten muss ein wichtiger Zwischenschritt erfolgen, um das Paraffin vollständig auszuschwemmen. Man bezeichnet es als Entparaffinieren und setzt dafür z.B. Xylol in 3 unterschiedlichen Konzentrationen ein. Danach müssen die Präparate an die chemische Zusammensetzung der Färbelösung angepasst und in eine absteigende Alkoholreihe (100, 96, 90, 80 und 70 %) überbracht werden. Sie verbleiben in jeder Lösung ca. 2 bis 5 min. und werden zum Schluss mit Aqua dest. ausgespült (Mulisch and Welsch, 2015). Als Routinefärbungen werden die Hämatoxylin-Eosin-, Azan-, Masson-Trichrom- und Goldner-Färbung eingesetzt (Welsch and Deller, 2010).

2. LITERATURÜBERSICHT

	Zellkerne	Zytoplasma	Bindegewebsfasern			Hyaliner Knorpel	Muskelzellen
			elastische	kollagene	retikuläre		
Azan	rot	blassrot bis blassblau	orange	blau	blau	blassblau	rot
Goldner	braun-schwarz	orange bis rot	-	grün	-	-	blassrot
Hämatoxylin-Eosin (HE)	blau	blassrot	rosa	rot	-	blassblau bis violett	dunkelrot
van Gieson	braun bis schwarz	gelblich braun	gelb	rot	-	rot	rot

Abbildung 7: Resultate einiger wichtiger histologischer Färbungen (Sinowatz, 2019)

2.5.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Zur Auswertung von gesunden oder pathologischen Befunden des zu untersuchenden Gewebes ist eine Kernfärbung unerlässlich. Es werden die Menge und Verteilung von Eu- und Heterochromatin ausgewertet, um Strukturveränderungen und die Zellaktivität des Zellkerns zu beurteilen. Beispielsweise besitzen maligne Tumorzellen einen heterogenen Zellkern. Jeder Zelltyp kann an seiner Zellkernstruktur erkannt werden, daher wird als Standardmethode der histologischen Diagnostik für die Kernfärbung vor allem die HE-Färbung eingesetzt (Mulisch and Welsch, 2015). Hämatoxylin wird aus dem Blauholzbaum gewonnen und bildet erst färbende Eigenschaften nach einer Oxidationsreaktion mit Luftsauerstoff zu Hämatein aus. Der Zeitraum der Oxidationsreaktion kann über eine längere Zeit andauern, daher bewirkt man mit einer

2. LITERATURÜBERSICHT

Zugabe von Oxidantien wie Kaliumiodat oder Natriumiodat eine schnellere Reaktion (Mulisch and Welsch, 2015; Sinowatz, 2019). Durch die weitere Zugabe von Aluminiumionen entsteht der erzielte Farbstoff Hämalan, wodurch alle sauren Strukturen (basophil) wie Zellkerne mit der enthaltenen Desoxyribonukleinsäure (DNA) und endoplasmatisches Retikulum (ER) schwer lösliche Verbindungen eingeht und blau gefärbt werden (Mulisch and Welsch, 2015). Die vollständige Färbung erfolgt in Kombination mit dem Farbstoff Eosin, welcher alle basischen Strukturen (eosinophil) wie Zytoplasma und Interzellulärsubstanz rot anfärbt und zur Gruppe der Fluoreszeine gehört (Sinowatz, 2019). Sind die Färbungen zu intensiv, kann für Hämatoxylin eine Entfärbung mit HCl-Ethanol und Eosin mit 70 %igen Ethanol erfolgen (Mulisch and Welsch, 2015).

2. LITERATURÜBERSICHT

2.5.4.2 Azanfärbung nach Heidenhain

Die Azanfärbung ist eine weitere Kernfärbung in der Histologie und man zählt sie zu den Trichrom-Färbungen (Färbung mit 3 Farbstoffen). Der Farbstoff Azokarmin löst eine Färbung des kompletten Gewebes aus und wird durch Beizung mit Phosphorsäure aus dem Bindegewebe durch eine Konkurrenzreaktion verdrängt. Dadurch wird das Bindegewebe entfärbt, aber die Zellkernfärbung bleibt durch eine feste Bindung mit dem hohen Anteil an basischen Proteinen bestehen. Die Zugabe vom Gemisch aus den sauren Farbstoffen Orange-G und Anilinblau bewirkt die endgültige Färbung der Präparate, aber durch unterschiedliche Verteilungsgrößen und Durchmischungszeiten lagern sie sich anders an. Orange-G dringt wie Azokarmin in alle Gewebe ein, wird aber im Parenchym überdeckt. Anilinblau führt zur endgültigen Färbung des Bindegewebes (Mulisch and Welsch, 2015). In Tabelle 1 werden die Hämalaun-Eosin- und Azanfärbeprotokolle gegenübergestellt.

2. LITERATURÜBERSICHT

Tabelle 1: Anleitungen HE-Färbung und Azanfärbung (Mulisch and Welsch, 2015)

Hämalaun-Eosin-Färbung (HE)	Azanfärbung nach Heidenhain
Entparaffinieren in Xylol I und Xylol II je 5-10 min	Entparaffinieren in Xylol I und Xylol II je 5-10 min
Rehydrierung über absteigende Ethanolreihe 100 %, 100 %, 96 %, 96 % und 70 % je 2-5 min	Rehydrierung über absteigende Ethanolreihe 100 %, 100 %, 96 %, 96 % und 70 % je 2-5 min
Spülung in Aqua dest. oder Leitungswasser	Spülung in Aqua dest. oder Leitungswasser
Hämalaun nach Mayer (Kernfärbung) 5-10 min	Vorgewärmte Azokarminlösung bei 56 °C 10-15 min

2. LITERATURÜBERSICHT

<p>„Bläuen“ in fließendem, sauberem Leitungswasser (Farbänderung von rot nach blau und Stabilisierung der Farbe durch pH-Wert-Änderung)</p> <p>10-15 min</p>	<p>Abspülen mit Aqua dest.</p>
<p>Eosin, wässrig 0,1 % (Zytoplasmafärbung)</p> <p>1-5 min</p>	<p>Differenzierung in Anilinethanol bis nur noch Zellkerne gefärbt sind (Beschleunigung durch Zugabe von Aqua dest. möglich)</p>
<p>Differenzierung durch kurze Spülung mit Aqua dest.</p>	<p>Auswaschen in Essigsäure-Ethanol Differenzierung, wenn Gewebe noch zu rot Präparat wieder zurück in Anilinethanol</p> <p>30-60 sec</p>

2. LITERATURÜBERSICHT

Dehydrierung in aufsteigender Ethanolreihe 70 % kurze Spülung 96 %, 96 % je 1 min 100 %, 100 % je 2-5 min	Beizen in 5 % wässriger Phosphorwolframsäure 1-3 h
Aufhellen und vollständige Entfernung von Ethanol Xylol I und Xylol II je 2-5 min	Spülung mit Aqua dest.
Eindecken	Anilinblau-Orange-G-Essigsäure (1:3 verdünnt) 1-3 h
	Kurze Spülung mit Aqua dest.
	Differenzierung mit 96 % Ethanol

2. LITERATURÜBERSICHT

	<p>Dehydrierung in aufsteigender Ethanolreihe</p> <p>70 % kurze Spülung</p> <p>96 %, 96 % je 1 min</p> <p>100 %, 100 % je 2-5 min</p>
	<p>Aufhellen und vollständige Entfernung von Ethanol Xylol I und Xylol II</p> <p>je 2-5 min</p>
	<p>Eindecken</p>

2. LITERATURÜBERSICHT

2.5.5 Eindecken der Präparate

Vor dem Eindecken ist eine Nachbearbeitung der Färbung zum Erzielen von guten Ergebnissen unabdingbar. Überschüssige Farblösung muss durch Auswaschen entfernt werden und das Präparat für das vorhergesehene Eindeckmedium zur Haftung und Haltbarmachung vorbereitet werden. Für die bestmögliche Bewertung der Präparate unter dem Lichtmikroskop muss der Brechungsindex des Eindeckmediums dem des Objektträgers nahe sein. Diese Angaben werden vom Hersteller vorgegeben. Im Allgemeinen unterscheidet man:

- Wasserlösliche (= hydrophile) Eindeckmedien
- Wasserunlösliche (= hydrophobe) Eindeckmedien

Meistens handelt es sich um ein wasserunlösliches Eindeckmedium und das Präparat muss in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert werden sowie ins Lösungsmittel Xylol überführt werden, wodurch wiederum Artefakte entstehen können. Die wasserlöslichen Eindeckmedien dagegen können nach der Färbung und Spülung mit Aqua dest. eingesetzt werden (Sinowatz, 2019).

Es gibt keine Standardmethode zum Eindecken, sondern jeder Durchführende muss sich seine eigene Technik aneignen. Es ist dabei unbedingt zu beachten, dass das Deckglas größer ist als der Schnitt und ein ausreichender Tropfen Eindeckmedium

2. LITERATURÜBERSICHT

auf den Schnitt oder Deckglas gebracht wird. Danach wird das Deckglas auf den Schnitt gelegt. Hier gilt es Luftblasen zu vermeiden, wobei es sich bewährt hat das Deckglas an einer Kante im spitzen Winkel zum Objektträger anzusetzen und vorsichtig abzusenken. Um das Eindeckmedium gleichmäßig zu verteilen, kann leichter Druck ausgeübt werden und die Präparate mit Bleigewichten von 15 bis 20 g beschwert werden. Die Trocknung erfolgt normalerweise bei Zimmertemperatur, kann aber auch mit einem Umluft-Wärmeschrank beschleunigt werden, wobei die Temperatureinstellung nach Erfahrungswerten erfolgt (Mulisch and Welsch, 2015). Als gängigste Eindeckmedien werden Kanadabalsam, DePeX und Eukitt verwendet (Sinowatz, 2019).

2.5.6 Artefakte

Zur Beurteilung der Präparate ist es vorteilhaft mögliche Artefakte zu kennen, um diese von pathologischen Veränderungen unterscheiden zu können. Diese können wie bereits erwähnt während der Herstellung von histologischen Präparaten durch Fixierungen, fehlerhaftes Schneiden und Färbelösungen sowie Lösungsmittel entstehen (Welsch and Deller, 2010).

2. LITERATURÜBERSICHT

Es kann zu sogenannten Schrumpfungspänomenen kommen, wodurch sich Schrumpfspalten oder gar Schrumpfräume entwickeln können. Diese Risse entstehen an der Grenze zwischen den Geweben wie Kollagenfaserbündeln, Epithelien und Bindegewebe (Mulisch and Welsch, 2015; Welsch and Deller, 2010). Bei zu späten Fixierungen und Verlust von Funktionsfähigkeiten der Membranpumpen wird Wasser in die Zelle geschleust, was sich als helle Zellen oder Quellungen darstellt. Färbungsartefakte wie dunklere Randzonen und hellere Zentren werden durch zu große Präparate begünstigt. Eine Fleckenbildung kann sich durch unsaubere Färbelösungen ausbilden. Beispielsweise bilden sich bei einer unsauberen Formolfixierung braune Flecken. Bei zu langsamen Fixierungen kann es zu einer Verdrängung der Zellen auf eine Seite kommen, was z.B. durch Glykogen begünstigt wird. Durch den Einsatz von Ethanol können Fetteinschlüsse aus den Zellen gelöst werden, was sich in farblosen Vakuolen darstellt. Schlechte Qualitäten des Mikrotommessers können Kerben und Risse bei den Präparaten verursachen. Feste und kalkhaltige Gewebe verschlechtern die Schnitffähigkeit und führen zur Spaltenbildung (Mulisch and Welsch, 2015).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Probanden

Zur Untersuchung wurden Augen von Masthähnchen der Linie Ross 308 aus einem konventionellen südbayrischen Mastbetrieb mit geschlossenem Geflügelstall in Bodenhaltung genutzt und fanden im Rahmen des Projektes „Licht“ der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische in Oberschleißheim unter der Bearbeitung der Gesichtspunkte Tierproduktion und Tierschutz (Schmidt, 2020) sowie Tieraugengesundheit (Schneeganß, 2018) statt. Es handelte sich insgesamt um 200 Tiere, die jeweils zu 100 Tieren in eine Kontrolltiergruppe und eine Versuchstiergruppe zufallsartig aufgeteilt wurden. Daraus resultierte eine Anzahl von 400 zu untersuchenden Augen. Die Verteilung der Geschlechter ergab sich zu 51 % männlich (91 Tiere) und 49 % weiblich (89 Tiere), 20 Tiere der Kontrollgruppe sind aufgrund fehlender Sektionen unbekanntes Geschlechts.

Die Einstallung wurde mit 34.700 Tieren begonnen bei einer Besatzdichte von 20 Tieren pro m². Die Tiere wurden auf einem mit Dinkelspelzen eingestreuten Boden gehalten und mit einem dreiphasigen kommerziellen Alleinfuttermittel ad libitum aufgezogen. Zudem wurde der ständige Zugang zu Wasser

3. MATERIAL UND METHODEN

gewährleistet. Während der gesamten Mastperiode wurden die Tiere am Tag zweimal durch das Stallpersonal kontrolliert und die Auffälligkeiten dokumentiert. Die Mastdurchgänge der 200 Masthähnchen der vorliegenden Studie wurden über 4 Monate von Juni bis September 2016 mit unterschiedlichen Beleuchtungsprogrammen durchgeführt.

Die Beleuchtungsprogramme für Kontrolltier- und Versuchstiergruppe wurden mit baugleichen Geräten realisiert. Hierbei handelte es sich um dimmbare warm-weiße (3.000 K) T8-Leuchtstoffröhren 58 W/50 Hz. Diese sind flackerfreie Neonröhren mit tageslichtadäquaten Spektren. Die Verwendung von Jalousien verhinderte den direkten Tageslichteinfall der in den Stall integrierten 85 Fenster, wodurch die Regulierung der Lichtmenge und -qualität in vollem Umfang möglich war. Kontrolltier- und Versuchstiergruppe wurden mit unterschiedlichen Beleuchtungsprotokollen behandelt, die sich lediglich in der Lichtintensität unterschieden, wobei für die Kontrolltiergruppe ein kontinuierliches und für die Versuchstiergruppe ein diskontinuierliches Lichtprogramm angewandt wurde. Zur Kontrolle der Lichtintensität wurden in den Ställen sowohl der Kontrolltier- als auch der Versuchstiergruppe stationäre Messstationen installiert und mobile Spektrometer zur Messung genutzt. Die Licht- und Dunkelphasen verzeichneten in beiden Gruppen die gleiche

3. MATERIAL UND METHODEN

Dauer. Es wurde an den ersten beiden Masttagen mit einer Lichtdauer von 24 Stunden begonnen. Ab dem 3. Masttag wurde eine Dunkelphase mit einer Dauer von 2 Stunden eingeführt. Diese wurde täglich um 2 Stunden erhöht bis zum Erreichen von 6 Stunden am 7. Masttag. Dieses Beleuchtungsschema wurde über 11 weitere Tage fortgeführt. An den Masttagen 29-32 wiederum wurde auf eine Dunkelphase von 1 Stunde reduziert, aber ab dem 33. Masttag wieder auf 6 Stunden Dunkelphase erhöht. Diese wurde bis 3 Tage vor der Schlachtung beibehalten und somit ab dem 39.-41. Masttag auf 1 Stunde Dunkelphase reduziert. Der 42. Masttag entspricht dem Tag der Schlachtung. Die Lichtintensität dagegen variierte zwischen Kontrolltier- und Versuchstiergruppe. Denn die Haltung der Kontrolltiergruppe erfolgte durchgängig mit der gesetzlich vorgeschriebenen Lichtintensität nach TierSchNutzV§19 Absatz 1 Satz 1 Nummer 4 vorgeschriebenen 20 Lux. Die Haltung der Versuchstiergruppe erfolgte unter einem diskontinuierlichen Beleuchtungsprogramm mit stufenweiser Reduktion der Lichtintensität von 20 Lux auf 5 Lux ab dem 10. Masttag: Vom 10.-12. Masttag wurde auf 15 Lux reduziert, ab dem 13. Masttag wurde um weitere 5 Lux auf 10 Lux reduziert und am 18. Masttag stellte sich die erzielte Lichtintensität von 5 Lux ein. Dies wurde bis zur Schlachtung an Tag 42 beibehalten. Um die

3. MATERIAL UND METHODEN

gewünschten Lichtintensitäten zu gewährleisten, wurde der Tageslichteinfall entsprechend durch die verwendeten Jalousien angepasst.

Tabelle 2: Lichtintensitäten (in Lux) und Dunkelphasen (in h) während der Mastperiode (Schneeganß, 2018)

Masstag	Lichtintensität in Lux		Dunkelphase in h
	Kontrollgruppe	Versuchsgruppe	Kontroll- und Versuchsgruppe
0-2	20	20	0
3-4	20	20	2
5-6	20	20	4
7-9	20	20	6
10-12	20	15	6
13-17	20	10	6
18-28	20	5	6
29-32	20	5	1
33-38	20	5	6
39-42	20	5	1

3. MATERIAL UND METHODEN

Jeweils 10 Tiere wurden am Tag 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30 und 40 vom Stallpersonal zufällig gefangen und zur Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische in Oberschleißheim tierschutzgerecht transportiert. In der Klinik wurden im Rahmen vorangegangener Studien eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt: allgemeine klinische Untersuchung, allgemeine ophthalmologische Untersuchung, spezielle ophthalmologische Untersuchungen wie Sonographie und optische Kohärenztomografie (OCT), unter Genehmigung eines Tierversuchsvorhaben durch die Regierung von Oberbayern mit dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-63-2015. Nach Abschluss der Untersuchungen und der vorangegangenen Anästhesie mit Isofluran[®] CP 1 ml/ml (CP – Pharma[®], Burgdorf, Deutschland) wurde eine tierschutzgerechte Euthanasie durchgeführt. Hierbei wurde Release[®] 300 mg/ml (WDT[®], Garbsen, Deutschland), ein Pentobarbital, in einer Dosierung von 1 ml/kg intravenös verabreicht.

3.2 E nukleation und Fixierung

Nach der fachgerechten Feststellung des Todes der Tiere erfolgte an den entsprechenden Untersuchungstagen die sofortige Entnahme und Fixierung der Augen in der Davidson-Lösung zur weiteren Asservierung.

Die E nukleation der Augen wurde unter Verwendung der Technik von Korbel (1994) und Werther et al. (2011) durchgeführt, die gemäß den Modifikationen von Saunders and Rubin (1975), angepasst wurde. Dabei wurden die Augenlider mithilfe einer Pinzette nach Adson ohne Zähne geschlossen und eine kleine Inzision im Bereich der Haut des Unterlides mit einer gebogenen Metzenbaumschere vorgenommen. Anschließend erfolgte eine stumpfe, zirkuläre Freipräparation der Lidhaut unter Schonung der Bindehaut. Die Präparation der intraorbitalen Adnexe, einschließlich der Durchtrennung der Muskeln und des Sehnervs rund um den Augapfel, wurde weiterhin mit einer kleinen gebogenen Metzenbaumschere durchgeführt, wobei die Form der Schere genutzt wurde, um unnötige Einschnitte und Beschädigungen zu vermeiden. Es wurde darauf geachtet, jegliche Druckausübung auf das gesamte Auge zu vermeiden, um Rupturen und Artefakte zu verhindern. Nach erfolgreicher E nukleation wurden Feinpräparationen an den Augen

3. MATERIAL UND METHODEN

durchgeführt, bei denen verbliebene Gewebsreste entfernt wurden, um das Eindringen der Fixationslösung zu gewährleisten.

Unmittelbar nach der E nukleation wurde eine Parazentese durchgeführt, wobei Davidson-Lösung in Insulinspritzen unterschiedlicher Volumina injiziert wurde, abhängig von der Größe des jeweiligen Auges. Die genauen Injektionsmengen sind in Tabelle 3 im Vergleich zwischen Kontrolltier- und Versuchstiergruppe an den Untersuchungstagen zusammen mit den Volumina der Präparationsgefäße aufgeführt. Um dem Zusammenfall der vorderen Augenkammer und Fixationsartefakten entgegenzuwirken (Dorobeck, 2013; Korbel, 1994; Ravelhofer, 1996; Werther et al., 2011) wurde die Davidson-Lösung unmittelbar vor dem Skleralring in die vordere Augenkammer appliziert.

3. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 3: Verwendete Davidson-Lösung zur Parazentese und Präparationsgefäß

Tage	Menge zur Parazentese Kontrolltiere	Menge zur Parazentese Versuchstiere	Menge im Präparationsgefäß Kontrolltiere	Menge im Präparationsgefäß Versuchstiere
1	0,05 ml	0,05 ml	20 ml	20 ml
2	0,05 ml	0,05 ml	20 ml	20 ml
3	-	0,05 ml	-	20 ml
5	0,08 ml	0,08 ml	20 ml	20 ml
7	0,08 ml	0,1 ml	25 ml	25 ml
10	0,08 ml	0,1 ml	30 ml	30 ml
15	0,1 ml	0,15 ml	40 ml	40 ml
20	0,15 ml	0,16 ml	40 ml	40 ml
30	0,18 ml	0,2 ml	40 ml	40 ml
40	0,2 ml	0,3 ml	40 ml	40 ml

3. MATERIAL UND METHODEN



Abbildung 8: E nukleation an Versuchstag 3

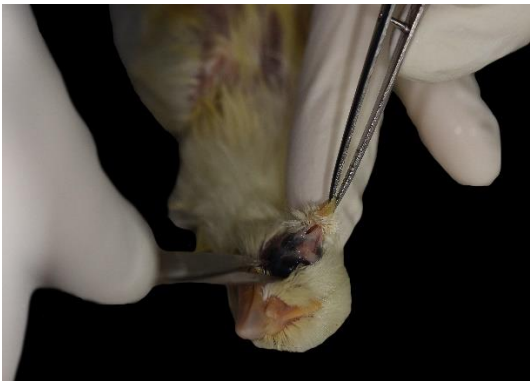


Abbildung 9: Parazentese

3. MATERIAL UND METHODEN

Danach wurde das gesamte Auge in das Präparationsgefäß mit vorbereiteter Davidson-Lösung überführt und bis zur weiteren Bearbeitung bei einer Temperatur zwischen 2-4 °C gelagert. Die Menge der Davidson-Lösung wurde der Größe der Augen und der histologischen Probengefäße angepasst, die sowohl aus Plastik als auch aus Glas bestanden. Diese Probengefäße wurden mit einem Permanentmarker der Fa. Edding® in der Farbe schwarz für die Kontrolltiergruppe und in der Farbe rot für die Versuchstiergruppe beschriftet. Dies geschah in folgendem Format: Datum der Eukleation, fortlaufende Tiernummer (1-200) und OS oder OD. Die Vorbereitung der Gefäße, die die Beschriftung und das Einfüllen der Davidson-Lösung beinhaltet, fand am gleichen Tag der Eukleation statt. Die Herstellung der Davidson-Lösung erfolgte durch eine Mitarbeiterin der histologischen Abteilung der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische in Oberschleißheim. Die entsprechende Zusammensetzung ist in der folgenden Tabelle 4 einzusehen:

3. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 4: Zusammensetzung Davidson-Lösung

Chemikalien	Menge in ml	Hersteller
95 % Ethanol	600 ml	Fa. Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Destilliertes Wasser	600 ml	
37 % Formalin	400 ml	Fa. Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eisessig	200 ml	Fa. Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

3.3 Entwässerung

In den Jahren 2018 bis 2020 wurden die Proben für die histologische Untersuchung in der histologischen Abteilung der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische in Oberschleißheim weiterverarbeitet. Die Augen wurden nicht als Ganzes entwässert, sondern nur die einzelnen Korneae. Dazu wurden die Augen in einer horizontalen Ebene mit handelsüblichen Rasierklingen kallotiert, um die vordere Augenkammer von der hinteren Augenkammer zu trennen, wobei eine direkte Ausübung von Druck bei der Fixierung auf den Bulbus vermieden werden musste, um die Strukturen zu erhalten (Dorobeck, 2013; Ravelhofer, 1996; Werther et al., 2011). Die hintere Augenkammer wurde vollständig ins Präparationsgefäß zurücküberführt, da in dieser Studie nur die vordere Augenkammer, insbesondere die Kornea, untersucht wurde. Diese wurde frei präpariert, indem der Skleralring und die Sklera, die die Kornea begrenzen, sauber und sorgfältig mit einer kleinen geraden spitzen Gewebeschere entfernt wurden. Zur Markierung der richtigen Ausrichtung in der Einbettkassette sowie zur späteren Orientierung wurde ein kleiner Teil der Sklera am Äquator im nasalen Winkel ausgespart. Die Choroidea, die Iris, die Linse und der Glaskörper wurden vorsichtig mit einer Pinzette nach Adson entfernt. Außerdem

3. MATERIAL UND METHODEN

wurden bei diesem Arbeitsschritt Messungen des Durchmessers der Kornea durchgeführt: Eine am fixierten kompletten Auge und eine nach der Trennung der vorderen und hinteren Augenkammer mit Isolierung der Kornea. Die vollständige Höhe der Kornea von dorsal nach ventral sowie die jeweilige Breite von nasal nach temporal wurden vermessen. Hierfür wurde ein handelsüblicher Messschieber von KAIKSO-IN[®] mit elektronisch digitaler Anzeige verwendet. Um sicherzustellen, dass jede Kornea dem richtigen Tier zugeordnet wurde, wurden die Einbettkassetten mit der jeweiligen Tiernummer und "OS" oder "OD" beschriftet. Nach erfolgreicher Präparation und Vermessung durchliefen die Korneae eine vollautomatische Entwässerung im Gewebereinbettautomat Spin Tissue Processor STP 120-2 (Fa. Myr[®] Especialidades Médicas, S.L. Spanien), bei dem manuell gesteuerte Programmeinstellungen möglich waren. Das in dieser Studie verwendete Programm basierte auf dem Entwässerungsprotokoll von Velasco Gallego (2015), das in Tabelle 5 dargestellt ist und 15 Stunden andauerte.

3. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 5: Entwässerungsprotokoll nach Velasco Gallego (2015) und genutzte Chemikalien

Flüssigkeit jeweils 1,25 l	Zeit in Minuten	Hersteller
Destilliertes Wasser	60 min	Fa. Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 70 %	60 min	Fa. Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 70 %	120 min	Fa. Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 96 %	60 min	Fa. Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 96 %	60 min	Fa. Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol 100 %	60 min	Fa. Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol 100 %	60 min	Fa. Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	60 min	Fa. Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	60 min	Fa. Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	60 min	Fa. Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Paraffin	50 min	MEDITE PURE™ Paraffin® (Fa. Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland)
Paraffin	50 min	MEDITE PURE™ Paraffin® (Fa. Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland)
Paraffin	60 min	MEDITE PURE™ Paraffin® (Fa. Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland)
Paraffin	80 min	MEDITE PURE™ Paraffin® (Fa. Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland)

3. MATERIAL UND METHODEN

Zu diesem Gewebeeinbettautomaten gehört ein Metallkorb, in dem die zugeschnittenen Korneae vorher in Einbettkassetten Macro[®] (Fa. Carl Roth[®] GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) übertragen wurden. Tabelle 5 zeigt ebenfalls die Auswahl der verwendeten Chemikalien zur Entwässerung, wobei die Mengenangabe den maximal zulässigen Füllständen der Behälter des Gewebeeinbettautomaten entspricht.

3. MATERIAL UND METHODEN



Abbildung 10: Gewebeeinbettautomat Spin Tissue Processor STP 120-2 (Fa. Myr® Especialidades Médicas, S.L. Spanien), Histologisches Labor Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische, Oberschleißheim

3.4 Einbettung und Paraffinschnitte

Nach der Entwässerung wurden die Korneae in Paraffinblöcke eingebettet. Hierfür wurde der Einbettautomat MILES TISSUE-TEK® Embedding Console System 4585 4586 4587 Cryo Dispensing Thermal verwendet, der sowohl ein Schmelzelement für das Paraffin als auch ein Kühlelement zur Aushärtung der gegossenen Blöcke besitzt. Das MEDITE PURE™ Paraffin® (Fa. Medite® GmbH, Burgdorf, Deutschland) wurde auf ca. 60 °C erhitzt, um es in einen flüssigen Zustand zu bringen und das Gießen der Blöcke zu erleichtern. Das flüssige Paraffin wurde in die metallenen Einbettformen gefüllt und auf die Kühlplatte mit einer Temperatur von etwa - 5 °C überführt. Nach kurzer Zeit konnten die Korneae darin aufgestellt werden, um die physiologische konvexe Form zu erhalten und mit der jeweiligen beschrifteten Einbettkassette versehen werden. Um sicherzustellen, dass die metallenen Einbettformen der Größen 1,1 cm x 1,9 cm x 2,8 cm und 1,0 cm x 1,9 cm x 3,2 cm (Fa. Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) vollständig gefüllt waren, wurden diese mit Paraffin befüllt, sodass auch die Einbettkassetten komplett paraffingefüllt waren. Die gegossenen Blöcke verblieben etwa 15 bis 30 min in den Einbettformen auf der Kühlplatte. Anschließend wurden sie aus der Einbettform gelöst und

3. MATERIAL UND METHODEN

weitere 60 Minuten auf der Kühlplatte belassen, um sie vollständig auszuhärten. Die Blöcke wurden auf Risse im Paraffin überprüft und ggf. mussten sie neu eingebettet werden. Bis zum weiteren Arbeitsschritt verblieben die Blöcke im Kühlschrank bei einer Temperatur zwischen 2 und 4 °C.

Zur Herstellung der Paraffinschnitte wurde das manuelle Rotationsmikrotom CUT 4062 (Fa. VWR® International GmbH, Darmstadt, Deutschland) in der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische genutzt. Die Paraffinblöcke wurden in Serie bei einer Dicke von 20 µm vollständig geschnitten und in ein Wasserbad mit 30 °C (Fa. Gesellschaft für Labortechnik® mbH, Burgwedel, Deutschland) überführt. Zum Auffangen von maximal 2 Schnitten aus dem Wasserbad wurden SuperFrost Plus™ Adhäsionsobjektträger® (Thermo Scientific®, Menzel, Braunschweig Deutschland) genutzt. Diese wurden am mattierten Rand mit dem Bleistift entsprechend der Tiernummer, Auge und Anzahl des Schnittes beschriftet. Die Objektträger mit den Schnitten wurden einzeln in Halterungen einsortiert und für den Trocknungsschrank (Fa. Memmert® GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) vorbereitet. Der Trocknungsvorgang erfolgte bei ca. 40 °C für 1 Stunde, gefolgt von einer Auskühlung bei Raumtemperatur.

3. MATERIAL UND METHODEN



Abbildung 11: Fertiger Paraffinblock

3.5 Färbung und Eindecken

Zur erfolgreichen Auswertung und Anfertigung histologischer Präparate wurden die Paraffinschnitte gemäß dem Färbeprotokoll der Azanfärbung nach Heidenhain eingefärbt. Die verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 6, während das genaue Färbeprotokoll detailliert in Tabelle 7 dargestellt wird.

3. MATERIAL UND METHODEN

Chemikalien	Mengenangabe	Hersteller
Azokarmin G	0,1 g	Fa. OMIKRON® Naturprodukte und Feinchemikalien, Rietberg, Deutschland
Eisessig	10 ml	Fa. Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Anilinblau	0,5 g	Chroma® Farbstoffe – Fa. Diagonal® GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland
Orange G	2 g	Fa. AppliChem® GmbH, Darmstadt, Deutschland
Anilinöl	1 ml	Fa. Merck®, Darmstadt, Deutschland
Wolframphosphorsäure	200 ml	Fa. Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
96 % Ethanol	1100 ml	Fa. Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Absteigende Ethanolreihe	jeweils 200 ml	Fa. Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Aufsteigende Ethanolreihe	jeweils 200 ml	Fa. Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 6: Benötigte Chemikalien Azanfärbung

3. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 7: Färbeprotokoll angewandter Azanfärbung nach Heidenhain

Flüssigkeit/ Alkohol	Farbstoff/	Zeit in Minuten
Xylol		(2x) 10 min
Xylol – Alkohol 50 %		5 min
Ethanol 100 %		(2x) 3 min
Ethanol 96 %		3 min
Ethanol 80 %		3 min
Ethanol 70 %		3 min
Ethanol 50 %		3 min
Aqua dest.		(2x) 3 min
Azokarminlösung (vorgewärmt 56°C)		10 – 15 min
Aqua dest.		Spülen

3. MATERIAL UND METHODEN

Anilin – Ethanol (Zellkerndifferenzierung)	ca. 5 sec
Essigsäure – Ethanol	Spülen ca. 30 – 60 sec (wenn Gewebe zu stark rot zurück in Anilin – Ethanol)
5 % wässrige Phosphorwolframsäure	Beizen 1 - 3 h
Aqua dest.	Spülen
Anilinblau – Orange G - Essigsäure	5 – 10 min
Aqua dest.	Spülen
Ethanol 96 %	Kurz spülen
Ethanol 70 %	Spülen
Ethanol 80 %	Spülen
Ethanol 96 %	1 min
Ethanol 100 %	(2x) 2 min

3. MATERIAL UND METHODEN

Xylol – Alkohol 50 %	5 min
Xylol	(2x) 5 min
Eindecken mit Depex (Fa. VWR® International GmbH, Darmstadt, Deutschland) und Deckgläsern (Fa. Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	

Die histologischen Präparate wurden abschließend mit dem Eindeckmedium Depex (Fa. VWR® International GmbH, Darmstadt, Deutschland) und jeweils der Präparatgröße angepassten Deckgläschen (Fa. Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) versiegelt. Die Präparate wurden zur Trocknung bei Raumtemperatur belassen. Alle Ergebnisse und Besonderheiten wurden für jedes einzelne Auge handschriftlich dokumentiert.

3.6 Lichtmikroskopie und Messungen der Kornea

In Zusammenarbeit mit der Anatomischen Anstalt des Lehrstuhls II für Neuroanatomie an der Ludwig-Maximilians-Universität München (Vorstand Prof. Dr. Schmitz) wurden zwischen 2021 und 2022 lichtmikroskopische Auswertungen der angefertigten Präparate durchgeführt. Dafür wurde das Systemmikroskop Axioskop Zeiss® (Fa. Carl Zeiss® AG, Oberkochen, Deutschland) verwendet, ein aufrechtes Mikroskop, das mit einem Binokular und einer Hellfeldbeleuchtung ausgestattet ist. Die Auswertung der Präparate erfolgte mit dem Objektiv Plan Neofluar® 10 x 30 und somit einer 10-fachen Gesamtvergrößerung. Darüber hinaus ist es mit einem MAC 6000 System von MBF Bioscience® zur Steuerung und zur Übertragung für die weitere Bearbeitung mit der Software Stereo Investigator 11, 11.01.2 64 bit von MBF Bioscience®, © 1995-2013 MBF Bioscience-MicroBrightField ausgestattet. Die Software Stereo Investigator wird häufig für stereologische und Volumenmessungen sowie für andere morphometrische Analysen von histologischen Schnitten eingesetzt. Durch verschiedene automatisierte Funktionen wird eine effiziente und präzise Analyse ermöglicht. In dieser Studie wurde nach einer Qualitätskontrolle der Präparate die

3. MATERIAL UND METHODEN

Messfunktion des Tools „Quick-measure-line“ angewendet. Hierzu wurden 20 Messpunkte entlang der Kornea von nasal nach temporal abhängig von der Augengröße an den entsprechenden Untersuchungstagen festgelegt, welche im 90 ° Winkel vom vorderen bis zum hinteren Korneaepithel gezogen wurden, um die Gesamtdicke der Kornea zu ermitteln. Die Ergebnisse wurden anschließend für jedes auswertbare Präparat in Exceltabellen übertragen.

3.7. Statistische Auswertung

Auf Basis einer Beratung durch das Institut für Statistik der Ludwig-Maximilians-Universität München (Stablab) stattfand, wurde eine statistische Analyse der gesammelten Datensätze in Excel mithilfe der Software Minitab® 21.4.1 (64-bit) (© 2023 Minitab, LLC., sowie Excel) durchgeführt.

Die lineare Regressionsanalyse der gesammelten Daten erfolgte unter Einbeziehung verschiedener Parameter. Die erstellte Regressionsgleichung $\text{Korneadicke (in } \mu\text{m)} = \text{gemessene/ursprüngliche Korneadicke (an Versuchstagen in } \mu\text{m)} - \text{abzüglich des Effekts der Lichtintensität (in Lux) bzw. Masttag, die mit der kumulierten Belichtungszeit (in h skaliert mit 100) multipliziert wird, zeigt die Beziehung zwischen den$

3. MATERIAL UND METHODEN

unabhängigen Variablen wie Tag oder Lichtintensität und der abhängigen Variablen Augendurchmesser oder Korneadicke, wobei die ermittelten Koeffizienten die Steigung und den Schnittpunkt der Regressionsgeraden darstellen. Durch statistische Maße wie die Standardabweichung, Mittelwert und das Bestimmtheitsmaß steht ein Bewertungsmaß zur Verfügung. Die grafische Darstellung der Messwerte erfolgte über Streudiagramme.

Die Analyse zur Entwicklung des Korneadurchmessers umfasste insgesamt 1.600 Messwerte und zur Entwicklung der Korneadicke insgesamt 1.280 Messwerte.

4. ERGEBNISSE

4.1 Lichtprogramm

Die Beleuchtungsbedingungen der Kontrolltier- und der Versuchstiergruppe wurden vorher festgelegt. Gemäß dem Beleuchtungsprogramm war in den ersten acht Tagen sowohl in der Versuchstier- als auch in der Kontrolltiergruppe eine Lichtintensität von 20 Lux vorgesehen. Anschließend war eine Reduzierung der Beleuchtungsintensität in der Versuchstiergruppe auf 5 Lux vorgesehen, sodass ab dem 21. Tag eine konstante Beleuchtungsintensität von 5 Lux beibehalten werden sollte. Die Beleuchtungsintensität der Kontrolltiergruppe sollte auf konstante 20 Lux eingestellt und beibehalten werden. Während der gesamten Versuchsperiode konnten jedoch Abweichungen der Beleuchtungsintensität vom festgelegten Beleuchtungsprogramm festgestellt werden. Die tatsächliche Lichtintensität in der Kontrolltiergruppe wich maximal um +/- 12 % und in der Versuchstiergruppe um maximal +/- 10 % von der geplanten Lichtintensität ab. Die Unterschiede der tatsächlichen Lichtintensität werden in Tabelle 8 dargestellt und zeigten sich sowohl in den ersten 8 Tagen als auch an Versuchstagen 11 und 21 mit geringfügiger Überschreitung der geplanten Lichtintensität in der

4. ERGEBNISSE

Versuchstiergruppe. Bei der Kontrolltiergruppe zeigten sich minimale Abweichungen der tatsächlichen Lichtintensität ab dem 22. Tag kontinuierlich bis zum 41. Tag mit einer Überschreitung von ca. 2 Lux.

4. ERGEBNISSE

Tabelle 8: Tatsächliche Lichtintensität der Kontroll- und Versuchsgruppe in Lux. Morgen- und Abenddämmerungsperiode jeweils 30 Minuten. Lichtintensität in der Skotophase < 0,5 Lux (Schmidt, 2020)

Aufzuchttag	Lichtintensität (Lux)		Photoperiode (L= Licht, D= Dunkel)
	Kontrollgruppe	Versuchsgruppe	
1 – 2	20,05 ± 0,07	20,14 ± 0,40	23L:1D
3 – 4	20,13 ± 0,02	21,04 ± 0,20	22L:2D
5 – 6	20,09 ± 0,02	20,14 ± 0,31	20L:4D
7 – 10	20,12 ± 0,11	19,67 ± 0,40	18L:6D
11 – 13	21,41 ± 0,23	14,18 ± 0,20	18L:6D
14 – 18	20,10 ± 0,14	10,14 ± 0,22	18L:6D
19 – 32	20,14 ± 0,12	5,23 ± 0,10	18L:6D
33 – 35	21,94 ± 0,61	5,41 ± 0,32	23L:1D
36 – 38	19,45 ± 0,32	5,30 ± 0,13	18L:6D
39 – 41	19,31 ± 0,17	4,92 ± 0,21	23L:1D

4.2 Korneadurchmesser

Die manuelle Vermessung der 400 Korneae im Durchmesser von nasal nach temporal und von dorsal nach ventral sowohl nach der Enukleation und Fixierung mit Davidson-Lösung als auch nach dem Zuschneiden zur Einleitung der Entwässerung hat die dargestellten Werte in den Tabellen 9-12 ergeben:

4. ERGEBNISSE

Tabelle 9: Mittelwerte der Korneadurchmesser (in mm) der einzelnen Tiergruppen OS von nasal nach temporal

Masttag	KT fixiert	KT zugeschnitten	VT fixiert	VT zugeschnitten
1	4,14	4,07	4,27	4,14
2	4,53	4,4	4,54	4,42
3	-	-	4,85	4,73
5	4,82	4,58	5,02	4,89
7	5,15	4,98	5,12	5,03
10	5,47	5,26	5,93	5,83
15	6,02	5,9	6,16	6,02
20	6,52	6,37	6,7	6,56
30	6,52	6,37	7,35	7,24
40	7,97	7,83	8,03	7,92

4. ERGEBNISSE

Tabelle 10: Mittelwerte der Korneadurchmesser (in mm) der einzelnen Tiergruppen OS von dorsal nach ventral

Masttag	KT fixiert	KT zugeschnitten	VT fixiert	VT zugeschnitten
1	4,04	3,93	4,14	4,03
2	4,36	4,23	4,42	4,33
3	-	-	4,7	4,61
5	4,59	4,35	4,89	4,77
7	4,95	4,84	5,01	4,91
10	5,26	5,06	5,82	5,72
15	5,88	5,78	6,06	5,95
20	6,37	6,21	6,56	6,42
30	6,37	6,21	7,24	7,12
40	7,84	7,68	7,93	7,81

4. ERGEBNISSE

Tabelle 11: Mittelwerte der Korneadurchmesser (in mm) der einzelnen Tiergruppen OD von nasal nach temporal

Masttag	KT fixiert	KT zugeschnitten	VT fixiert	VT zugeschnitten
1	4,13	4,02	4,23	4,1
2	4,51	4,36	4,6	4,48
3	-	-	4,85	4,74
5	4,84	4,59	5,02	4,9
7	5,14	4,96	5,13	5,03
10	5,49	5,27	5,93	5,83
15	6,08	5,88	6,19	6,05
20	6,51	6,35	6,9	6,57
30	7,18	7,02	7,35	7,25
40	7,97	7,83	8,06	7,91

4. ERGEBNISSE

Tabelle 12: Mittelwerte der Korneadurchmesser (in mm) der einzelnen Tiergruppen OD von dorsal nach ventral

Masttag	KT fixiert	KT zugeschnitten	VT fixiert	VT zugeschnitten
1	4,05	3,93	4,1	4
2	4,4	4,26	4,47	4,38
3	-	-	4,73	4,63
5	4,61	4,39	4,89	4,77
7	4,97	4,83	5,01	4,91
10	5,27	5,05	5,82	5,72
15	5,91	5,75	6,08	5,97
20	6,36	6,2	6,56	6,42
30	7,02	6,87	7,25	7,15
40	7,81	7,71	7,92	7,79

Die statistische Auswertung der angewandten Regressionsgleichung zur Beurteilung des Durchmessers der Kornea ergab keine signifikanten Unterschiede an den Untersuchungstagen zwischen Kontrolltier- und

4. ERGEBNISSE

Versuchstiergruppe. Der ermittelte p-Wert ($<0,05$) blieb konstant bei 0 und das Konfidenzintervall stellte sich zwischen 0,08154 bis 0,10135 ein. Es lässt sich erwartungsgemäß ein Trend sowohl an den Messwerten als auch an der grafischen Darstellung erkennen, dass sich eine Vergrößerung des Durchmessers im Laufe der Mastperiode durchgängig einstellt sowohl in der Kontrolltier- als auch Versuchstiergruppe. Die Werte der Versuchstiergruppe minimal über die der Kontrolltiergruppe liegt.

4. ERGEBNISSE

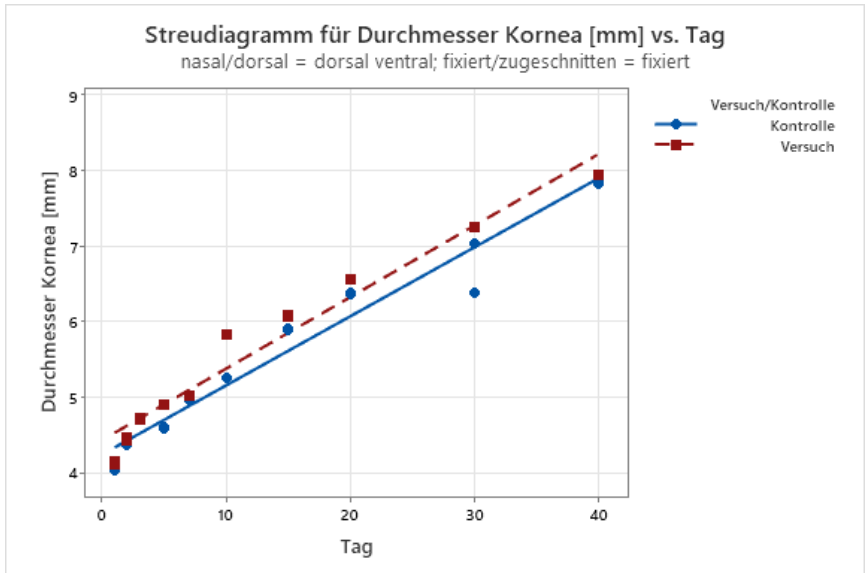


Abbildung 12: Darstellung Korneadurchmesser von dorsal nach ventral im fixierten Zustand des Auges

4. ERGEBNISSE

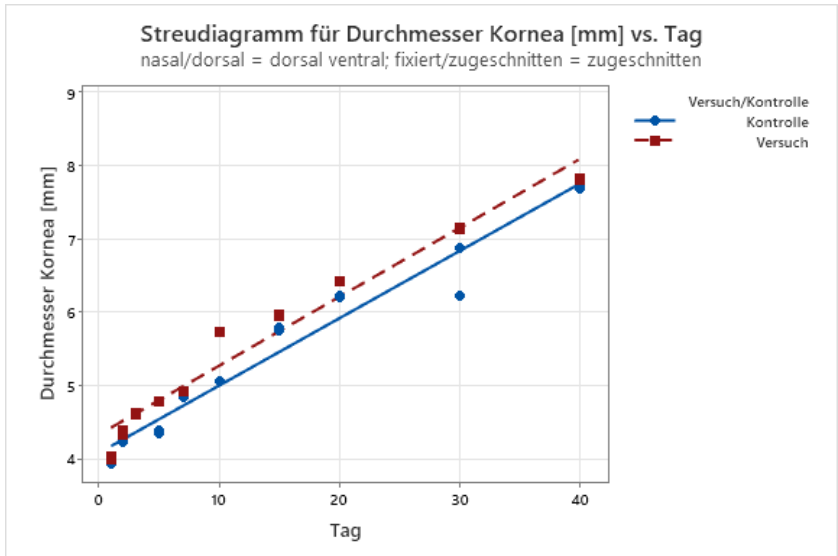


Abbildung 13: Darstellung Korneadurchmesser von dorsal nach ventral nach Zuschnitt für die Entwässerung

4. ERGEBNISSE

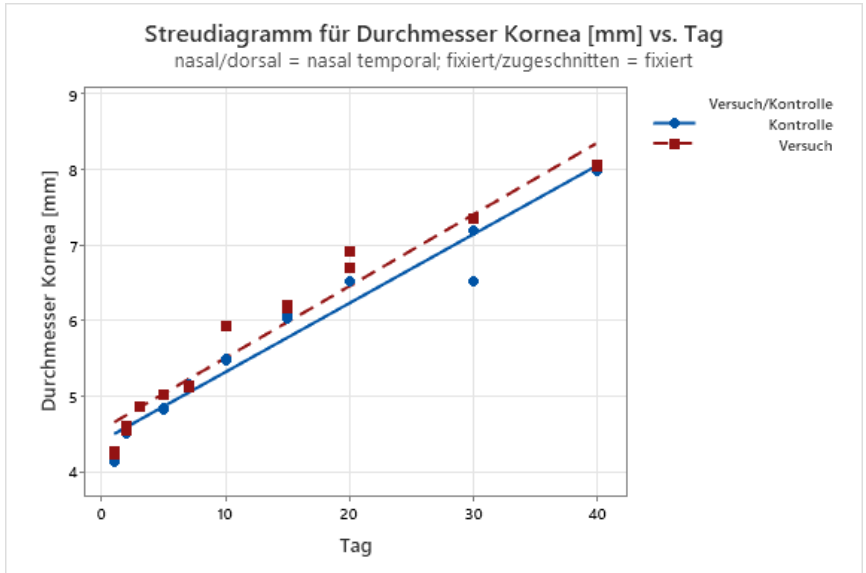


Abbildung 14: Darstellung Korneadurchmesser von nasal nach temporal im fixierten Zustand des Auges

4. ERGEBNISSE

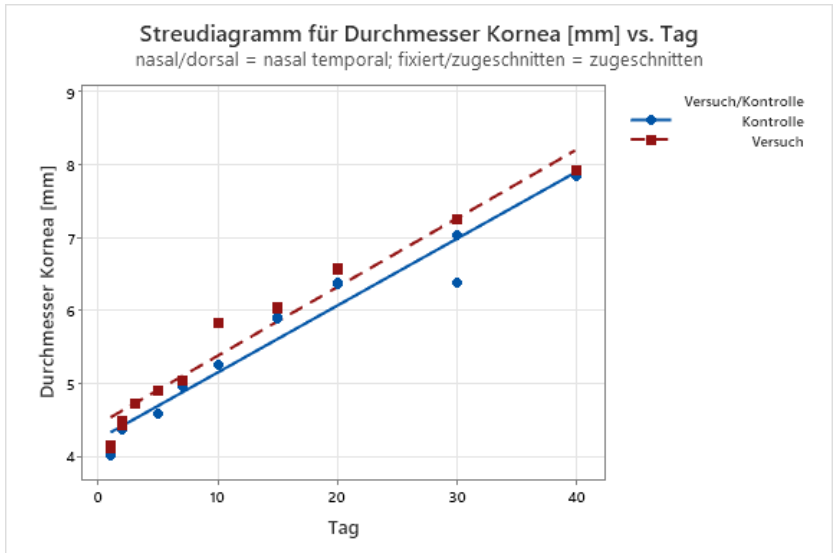


Abbildung 15: Darstellung Korneadurchmesser von nasal nach temporal nach Zuschnitt für die Entwässerung

4.3 Herstellung histologischer Präparate

Der Prozess zur Herstellung histologischer Präparate führte aufgrund der Komplexizität und der auch bereits von anderen Autoren (Korbel, 1994; Werther et al., 2011) beschriebenen, durch den bei Vögeln gegebenen knöchernen Skleralring induzierten Problematik bei der Kallottierung von Vogelaugen zu einem hohen Verlust an auswertbaren Präparaten. Der vollumfängliche Probenumfang der vorliegenden 400 Augen konnte lediglich zu 15,5 % mit insgesamt 64 Augen zusammen aus der Kontrolltier- und Versuchstiergruppe genutzt werden. Somit standen zur Auswertung 5 % (= 20 Augen) der Augen aus der Kontrolltiergruppe und 10,5 % (= 42 Augen) der Augen aus der Versuchstiergruppe zur Verfügung.

Bei der Herstellung von Paraffinschnitten zeigte sich trotz einer geschärften Messerklinge des Mikrotoms teilweise eine schlechte Schnittfähigkeit der Präparate sowohl durch eine zu starke Festigkeit als auch brüchige Konsistenz. Dabei zeichnete sich eine schlechte Haftbarkeit an den Objektträgern dieser Präparate ab. Nach dem folgenden Herstellungsschritt der Färbung zeichneten sich speziell bei Präparaten mit brüchiger Konsistenz folgende Veränderungen ab:

- Formverlust der konvexen Kornea

4. ERGEBNISSE

- hochgradige Lücken zwischen den einzelnen Schichten der Kornea
- Abtrennungen einzelner Strukturen bzw. kompletter Schichten
- Kompletter Strukturverlust durch z.B. Verdrillungen der Kornea auf der gesamten Länge, Faltenbildung, Überlappung, Stückelung

Ein weiterer erheblicher Verlust der histologischen Präparate von ca. 50 % trat während des Färbeprozesses auf. Die Überführung der Präparate in die einzelnen Alkohole und Farbstoffe führte teilweise oder generalisiert zur Ablösung vom Objektträger.

Alle übrigen angerfertigten histologischen Präparate wurden einer Qualitätskontrolle unterzogen. Bei der Bewertung wurde auf Artefakte wie Quellungen geachtet, die die Messung der Korneadicke verfälschen. Zur Auswertung der Vermessung der Korneadicke konnten 64 von 400 Augen herangezogen werden.

4. ERGEBNISSE

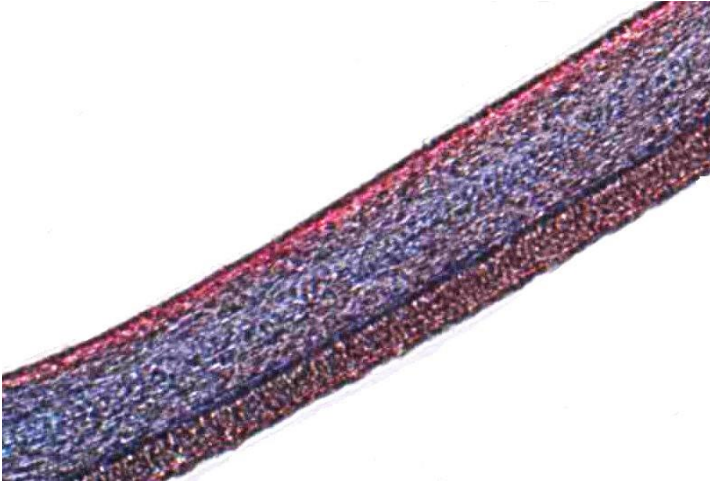


Abbildung 16: Präparat 165 OS mit allen Schichten

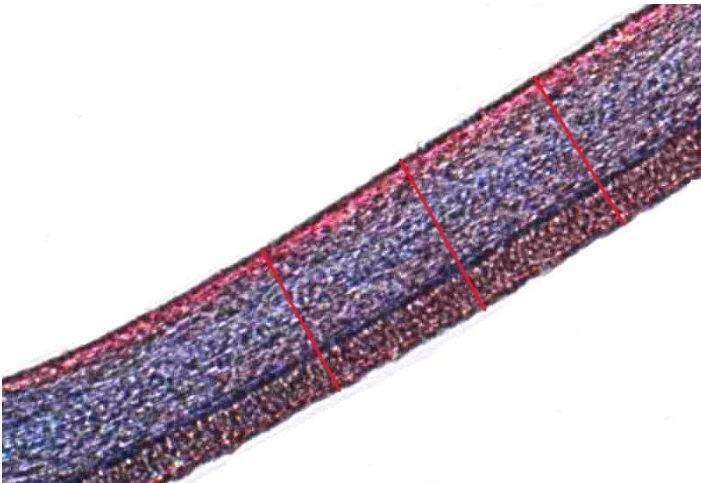


Abbildung 17: Präparat 165 OS mit Messlinien

4. ERGEBNISSE



Abbildung 18: Präparat mit zeigender Stückelung der einzelnen Korneaschichten



Abbildung 19: Präparat mit Zusammenhangstrennung einzelner Korneastrukturen



Abbildung 20: Präparat mit Spaltenbildung

4. ERGEBNISSE



Abbildung 21: Präparat mit hochgradiger Quellung

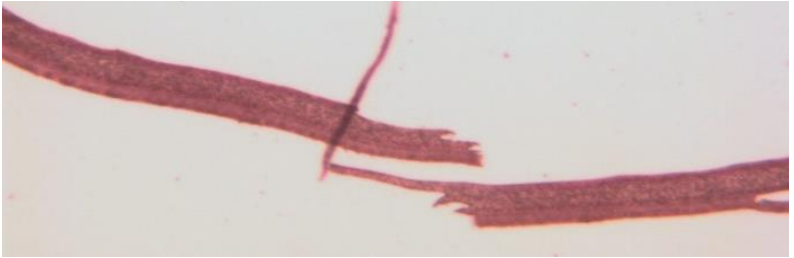


Abbildung 22: Präparat mit Stückelung und Überlappung von Strukturen

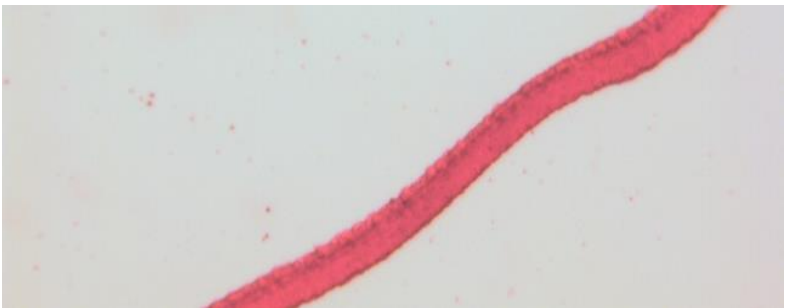


Abbildung 23: Präparat mit schlechter Anfärbarkeit

4.4 Korneadicke

Durch die Anwendung der linearen Regressionsanalyse mit der Gleichung $\text{Korneadicke (in } \mu\text{m)} = \text{gemessene/ursprüngliche Korneadicke (an Versuchstagen in } \mu\text{m)} - \text{Effekt der Lichtintensität (in Lux) bzw. Masttag, die mit der kumulierten Belichtungszeit (in h skaliert mit 100) multipliziert wird}$, wurde eine signifikante negative Korrelation zwischen der Lichtintensität bzw. an den Masttagen und der Korneadicke in der Versuchsgruppe festgestellt. Dabei ergaben sich folgende Werte:

Das Koeffizienziintervall der Versuchstiergruppe in Abhängigkeit der Lichtintensität ($\text{Lux} \times 100 \text{ h}$) liegt im Bereich zwischen $-0,7532$ und $-0,4309$ mit einem p-Wert ($<0,05$) bei 0 . Das Koeffizienziintervall der Versuchstiergruppe in Abhängigkeit der untersuchten Tage liegt im Bereich von $-1,48$ bis $-0,893$ bei einem p-Wert ($<0,05$) bei 0 .

Im Gegensatz dazu ergab die Analyse für die Kontrolltiergruppe ein Koeffizienziintervall in Abhängigkeit der untersuchten Tage zwischen $-0,307$ bis $0,337$ bei einem p-Wert ($<0,05$) von $0,393$ bis $0,971$. In Abhängigkeit zur Lichtintensität ($\text{Lux} \times 100 \text{ h}$) ein Koeffizienziintervall zwischen $-0,084$ bis $0,0794$ bei einem p-Wert zwischen $0,654$ bis $0,997$. Zur besseren Auswertung wurden die Werte der Lichtintensität mal 100 multipliziert.

4. ERGEBNISSE

Die bestehende negative Korrelation zeigt, dass mit abnehmender Lichtintensität die Korneadicke abnimmt und wird in den folgenden Streudiagrammen grafisch dargestellt. Eine deutliche Abnahme ist an Versuchstag 21 bei einer bereits reduzierten Lichtintensität von 5 Lux.

Allerdings sind an Tag 21, 31 sehr tiefe Werte auffällig und an Tag 41 im Gegensatz zu Tag 21 und 31 relativ hohe Werte auffällig.

Die Gesamtabnahme der Korneadicke betrug rund 20 μm . Prozentual ist daher eine Reduzierung der Korneadicke von rund 13 % zu verzeichnen.

Eine Gegenüberstellung der Werte des rechten und linken Auges war aufgrund der Datenerhebung nicht möglich, da zu keinen der Messpunkte beide Augen ausgewertet werden konnten. Somit erwies sich auch eine Auswertung der Daten in Abhängigkeit des Geschlechtes schwierig und wurde nicht statistisch erhoben.

4. ERGEBNISSE

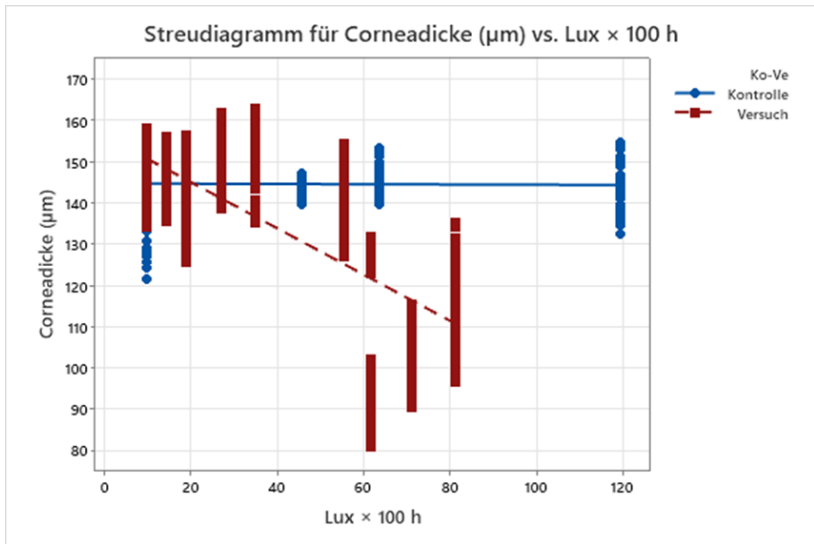


Abbildung 24: Darstellung Korneadicke zusammengefasst in Abhängigkeit Lichtintensität

4. ERGEBNISSE

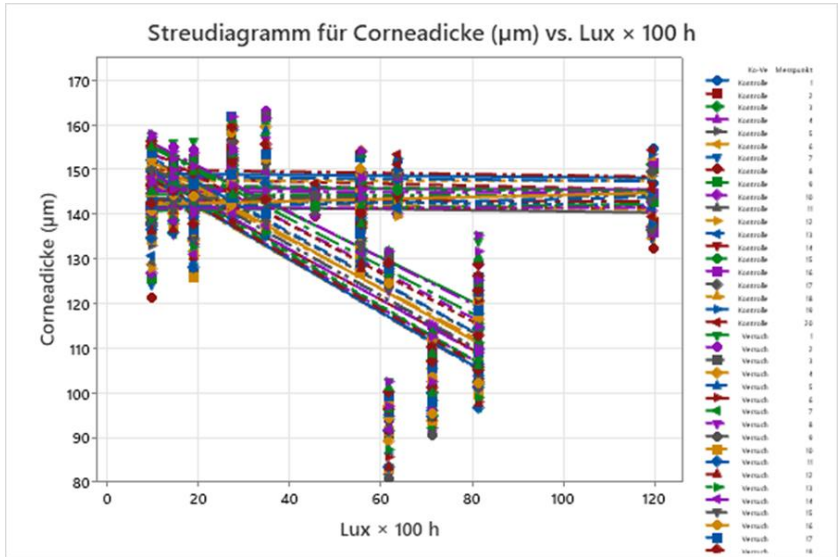


Abbildung 25: Darstellung Corneadicke gesamte Messpunkte in Abhängigkeit Lichtintensität

4. ERGEBNISSE

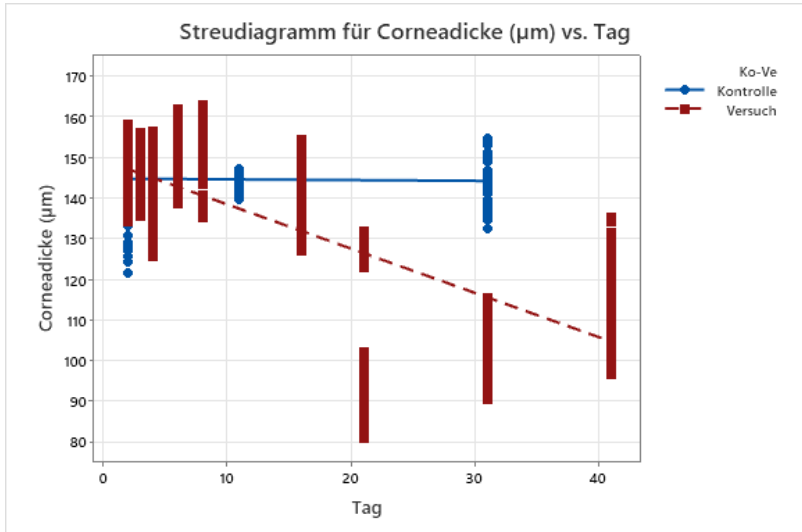


Abbildung 26: Darstellung der Corneadicke in Abhängigkeit der Masttage für die Kontroll- und Versuchsgruppe.

5. DISKUSSION

Die vorliegende Studie untersucht den Zusammenhang zwischen der Lichtintensität und der Korneadicke von Masthähnchenaugen, die unter diskontinuierlichen Lichtbedingungen gehalten wurden. Dies ist von besonderem Interesse im Hinblick auf tierschutzrechtliche Aspekte und mögliche Folgen für das Wohlbefinden der Tiere, insbesondere in Bezug auf veränderte Augenstrukturen, die durch das „light-induced avian glaucoma“ verursacht werden könnten. Die Korneadicke konnte mittels Azanfärbung und lichtmikroskopischer Untersuchung bei 15,5% der 400 Masthähnchenaugen ermittelt werden. Die Studie strebt an, ein besseres Verständnis für die Auswirkungen von Lichtbedingungen auf die Augenstruktur und das Wohlbefinden von Tieren zu erlangen (Blatchford et al., 2009; Gratta et al., 2023; Kang et al., 2023; Nickla and Totonelly, 2016; Rault et al., 2017; Schmidt, 2020; Weise, 2007).

5.1 Anzahl der Tiere und Beleuchtungsprogramm

Die in der Studie untersuchten Masthähnchenaugen entstammten der Linie Ross 308, die üblicherweise in konventionellen Masthähnchenhaltungen eingesetzt werden und aus spezialisierten Hühnerlinien mit bestimmten Selektionsverfahren stammt. Obwohl alle für die Studie einbezogenen Tiere eine ähnliche Genetik aufwiesen, können genetische Zufallsfaktoren physiologische Zustände beeinflussen und müssen bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. Die Maßnahmen der Zucht zur Veränderung genetischer Komponenten in Hinblick auf Stabilität, Vitalität und Immunstärke können Entwicklungsprozesse der Tiere und ihre Organsysteme beeinflussen (Siegmann and Neumann, 2011). Es obliegt somit künftigen Studien Beleuchtungsprogramme und Augenveränderungen in Bezug auf verschiedene Hühnerlinien weiterführend zu untersuchen und gegenüberzustellen. Die Fallzahl der zu untersuchenden Tiere war gemäß der vorangegangenen Studie von Schneeganß (2018) auf 100 Hühner pro Gruppe festgelegt und ermöglichte ihr eine statistisch fundierte Analyse. Daher ist es fraglich mit den hier vorliegenden auswertbaren Proben von 15,5 % eine

5. DISKUSSION

ausreichende Beurteilung abzugeben und Übertragbarkeit zu gewährleisten.

Die Untersuchungsergebnisse können neben genetischen Faktoren auch von Umweltfaktoren wie jahreszeitlichen Schwankungen beeinflusst werden (Siegmann and Neumann, 2011). Da die Tiere nicht gleichzeitig, sondern in zwei aufeinanderfolgenden Mastdurchgängen zwischen Juni und Juli sowie August und September 2016 untersucht wurden, ist ein Einfluss von Umweltfaktoren und jahreszeitlichen Schwankungen anzunehmen. Um diese möglichen Einflussfaktoren auszuschließen, sollte in weiteren Studien sowie die Kontrolltier- und Versuchstiergruppe im selben Zeitraum untersucht werden.

Das angewendete zirkadiane Beleuchtungsprogramm war durch die Vorgängerstudie Schneeganß (2018) und Schmidt (2020) festgelegt und beruht auf Beschreibungen in der Literatur, welche die Lichtintensitäten zwischen der Abhängigkeit des Verhaltens und Alters von Masthähnchen schildern (Appleby et al., 1992; Davis et al., 1999; Newberry et al., 1985; Weise, 2007). Die ursprüngliche Form des Haushuhns, bekannt als Bankivahuhn (*Gallus gallus*), entstand in den äquatorialen Waldgebieten Asiens, wo eine natürliche Beleuchtung von 12 Stunden Licht (12 L) und 12 Stunden Dunkelheit (12 D) während eines 24-stündigen Tageszyklus

5. DISKUSSION

herrschte. Dies steht im starken Kontrast zu den meisten zirkadianen Rhythmen, die derzeit in der Geflügelindustrie verwendet werden und viel kürzere Dunkelphasen aufweisen (Weeks and Butterworth, 2004). Olanrewaju et al. (2006) zeigte, dass in den ersten Lebenswochen der Masthühner ein zirkadianer Rhythmus von 23L:1D standardmäßig verwendet wird und in den folgenden Wochen unterschiedliche Phasen folgen. Typisch in der Hühnerhaltung wird ein Lichttag auf 8 h am Tag reduziert und in der Legeperiode auf 16-18 h erhöht (Siegmann and Neumann, 2011). Der zirkadiane Rhythmus wurde sowohl in der Kontrolltier- als auch Versuchstiergruppe identisch gehalten und ist daher in der Beurteilung nicht zu berücksichtigen.

5.2 Herstellung histologischer Präparate

Von den insgesamt 400 Augen, die für die Untersuchung zur Verfügung standen, konnten lediglich 15,5 % bzw. 64 Augen vollständig ausgewertet werden. Es wurden nur histologische Präparate für die Messung der Korneadicke herangezogen, welche nach der Azanfärbung eine klare Darstellung aller Schichten der Kornea aufwiesen, wie vorderes Hornhautepithel, Bowman-Membran, Stroma, Descemetsche Membran und hinteres Hornhautepithel (Frewein and Sinowatz, 2004), ohne das Vorhandensein von Artefakten. Bei 84,5 % der

5. DISKUSSION

histologischen Präparate war keine klare Differenzierung der Korneaschichten möglich oder Artefakte nachweisbar, sodass diese nicht für die Messung der Korneadicke mit einbezogen werden konnten. Die Ursachen hierfür müssen an verschiedenen Schritten zur Herstellung von histologischen Präparaten diskutiert werden.

Die empfohlene Eukleationszeit in weniger als 5 min. von Saunders and Jubb (1961) sowie die Vermeidung von Druck auf das Gewebe, um alle Strukturen zu erhalten (Ravelhofer, 1996; Werther et al., 2011) wurde trotz der anatomischen Besonderheiten von Vogelaugen und ihre altersbedingten unterschiedlichen Größen eingehalten, außer bei Kontrollgruppe 3, deren Augen aufgrund des überschrittenen Zeitraums verworfen und somit nicht in die Studie mit einbezogen wurden. Autolytische Prozesse in Folge einer zu langen Eukleationszeit und folglich Artefakte in weiteren histologischen Präparationen sind somit vernachlässigbar.

Nach Mulisch and Welsch (2015) können bei lang andauernden Fixierungen Strukturveränderungen entstehen, die die Präparate zu stark aushärten und brüchig werden lassen. Die Davidson-Lösung wird speziell für die Fixierung von Augengewebe empfohlen (Childow et al., 2011; Layton et al., 2019). Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Fixierung so schnell wie möglich nach der Eukleation erfolgen

5. DISKUSSION

muss, um eine rasche Penetration in das Gewebe zu gewährleisten und postmortale autolytische Veränderungen, aufgrund der schnellen Stoffwechselaktivität des Auges zu verhindern (Saunders and Jubb, 1961). Das Einbringen eines Fixans mittels Parazentese beugt dem Zusammenfall der vorderen Augenkammer durch den im Vergleich zum Säuger bestehenden straffen Skleralring vor (Korbel, 1994; Werther et al., 2011). Die teilweise mangelnde Schnitffestigkeit könnte sowohl auf eine lange Fixierungszeit zurückzuführen sein als auch auf das verwendete Fixans, die Davidson-Lösung selbst. Ravelhofer (1996) beschreibt eine vollständige Fixierung der Augen war nach 14 Tagen erreicht. Die lange Fixierungszeit von knapp 2 Jahren sowie der hohe Alkoholgehalt der Davidson-Lösung führen zu einer zunehmenden Brüchigkeit des Gewebes und können ebenso für schlechte Haftung der Präparate auf den Objektträgern ursächlich sein (Childow et al., 2011). Die Fixation mittels Davidson-Lösung beschreibt hauptsächlich gute Ergebnisse zur Darstellung der Retina, welche in der vorliegenden Studie jedoch nicht untersucht wurde (Latendresse et al., 2002). Für die Fixierung der Kornea sind weitere Fixantien wie bspw. Zenker-Flüssigkeit, die akzeptable Darstellungen der Korneamorphologie bietet und welche möglicherweise bessere Ergebnisse in der vorliegenden Studie erzielt hätten (Saby et al., 1991). Entscheidende

5. DISKUSSION

Faktoren zur Fixierung sind die Präparatgröße, eine ausreichende Menge und Konzentration der Fixierung, die Dauer und Temperatur der Fixierung, die Osmolarität sowie der pH-Wert (Mulisch and Welsch, 2015).

Zur Vorbereitung einer gleichmäßigen Festigkeit und daraus resultierenden Schnittfestigkeit des Präparates muss es zur Entwässerung in Alkohole unterschiedlicher Konzentrationen überführt werden. Dadurch können Schrumpfungen von 8-20 % des Volumens entstehen (Mulisch and Welsch, 2015; Sinowatz, 2019; Welsch and Deller, 2010), die zur Beurteilung der Ergebnisse herangezogen werden müssen. Für die Einbettung wird das Paraffin auf 60 °C erhitzt und anschließend bis zur Bildung des fertigen Blockes auf - 5 °C abgekühlt. Diese entstandenen Temperaturschwankungen können ein Ausdehnen und Zusammenziehen der Kornea begünstigen und zu Strukturveränderungen führen. Daher sollten in zukünftigen Studien Alternativen in Betracht gezogen werden. Mulisch and Welsch (2015) empfiehlt für die Einbettung von menschlichen Augen eine Celloidin-Paraffin-Methode. Ihr Vorteil besteht darin, dass Färbungen ohne Extraktion des Einbettmediums durchgeführt werden können, was den Alkoholverbrauch reduziert und die Schrumpfung verringert. Ein Nachteil ist jedoch der längere Zeitaufwand.

5. DISKUSSION

Für die Herstellung von Paraffinschnitten ist ein Mikrotom mit einer frischen, geschärften Klinge unerlässlich, was in der vorliegenden Studie entsprechend umgesetzt wurde. Ein Spalten- oder Streifenschnitt sowie eine Unterbrechung der Serienschritte war zu keinem Zeitpunkt in Folge einer stumpfen Klinge oder fehlerhaften Ausrichtung des Paraffinblockes gegeben. Eher kam es zu einem bröckeligen, bröseligen oder sogar gar nicht schneidbaren Paraffinblock. Dies könnte sowohl auf Probleme vorheriger Schritte der Fixierung und Entwässerung als auch auf eine schlechte Paraffinaufnahme zurückzuführen sein (Childow et al., 2011; Mulisch and Welsch, 2015).

Nach Mulisch and Welsch (2015) und Sinowatz (2019) liegen die routinemäßigen histologischen Schnittdicken zwischen 1-10 μm , um ein gutes Auflösungsvermögen und gute Haftbarkeit an den Objektträgern zu gewährleisten. In der vorliegenden Studie wurde eine Schnittdicke von 20 μm gewählt, um die entscheidenden Schnitte zur Auswertung um den Äquator des Auges zu erreichen und wenig Verwurf der Schnitte zu garantieren. Trotz der erhöhten Schnittdicke konnte keine Beeinträchtigung in der Auflösung der auswertbaren Präparate festgestellt werden, da die Schichten der Kornea im Einzelnen dargestellt werden konnten. Vermutlich wäre es bei dünneren Schnittpräparaten wie in der Studie von Hagen (2020)

5. DISKUSSION

verglichen mit der Netzhaut zu Verstärkungen der Brüchigkeit und schlechterer Haftung gekommen. Es ist jedoch wichtig zu beachten, dass beim Transfer in das ca. 30 °C warme Wasserbad potenziell technische Fehler auftreten können, wie das Verlieren des Schnittes von der Präpariernadel oder des Pinsels sowie das Zerreißen des Präparates oder Teile des Paraffins, was sich auf Strukturveränderungen auswirken kann (Mulisch and Welsch, 2015).

Zur Vorbereitung auf die Färbung müssen die Schnitte entparaffiniert werden und abermals in unterschiedliche Alkoholkonzentrationen sowie zur Färbung in alkoholhaltige Farbstoffe überführt werden. An dieser Stelle kann es zu Schrumpfungsphänomenen wie Spaltenbildungen oder Quellungen durch aufgehellte Bereiche im Präparat kommen. Auch unreine Farblösungen können zu fleckigen oder gar schlechter Anfärbung führen (Mulisch and Welsch, 2015). Zu keinem Zeitpunkt wurde der vorliegenden Studie verunreinigte Farbstoffe oder Alkohol-Lösungen im Färbeprozess genutzt.

Abschließend wird die lange Haltbarkeit der Präparate durch das Eindecken in diesem Fall mit Depex (Fa. VWR® International GmbH, Darmstadt, Deutschland) erreicht und sorgfältig drauf geachtet, dass während des Eindeckens keine Verschmutzungen oder Luftbläschen entstehen.

5. DISKUSSION

Zusammenfassend weist die angewandte Methode zur Herstellung histologischer Präparate wenig Erfolg auf, wodurch die Technik und Tagesverfassung des Anwenders sowie jahreszeitliche Gegebenheit durch Temperaturschwankungen bei Anfertigen der Schnitte und Trocknung zu berücksichtigen sein sollten.

Für Hühner sind verschiedene Protein-Enzyme in den Keratinozyten und Epithelzellen der Kornea nachgewiesen wie Transketolase, α -Enolasae, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (G3PDH), Lactatdehydrogenase, Pyruvatkinase, Proteindisulfid-isomerase und Annexin II (Jester et al., 2005), wodurch eine gute Grundlage gegeben ist, um Immunfluoreszenzfärbungen zu etablieren und die Kornea weiterführend mittels bspw. der Konfokalmikroskopie zu untersuchen. Mehrere Studien bei Säugetieren zeigen gute Erfolge der Darstellung mittels Immunfluoreszenz und Konfokalmikroskopie (Grieve et al., 2016; Hovakimyan et al., 2011). Nach Hagen (2020) ist bereits ein Protokoll zur Immunhistochemie und Konfokalmikroskopie der Retina am Vogelauge geeignet.

5.3 Auswertung Messergebnisse hinsichtlich statistischer Auswertung und Methodik

Zusammenfassend zeigen die Messergebnisse der vorliegenden Studie eine Reduktion der Korneadicke um insgesamt ca. 20 μm , somit ist eine prozentuale Reduktion von rund 13 % festzustellen.

Aufgrund der Festlegung eines statistisch relevanten Probenumfangs von jeweils 100 Tieren aus der Kontrolltier- und der Versuchstiergruppe der vorangegangenen Studie von Schneegaß (2018) ist, die in dieser Studie erfolgte statistische Aufstellung kritisch zu hinterfragen. Schneegaß (2018) zeigte, dass hinsichtlich abhängiger und unabhängiger Variablen Augenveränderungen mittels der dreidimensionalen Sonographie darstellbar sind, wie bspw. die Tiefe der vorderen Augenkammer oder den axialen Bulbusdurchmesser als abhängige Variable und demgegenüber gestellt als unabhängige Variable das Geschlecht, das Alter, das Licht oder das Gewicht. In der vorliegenden Studie hingegen wurde versucht das Geschlecht als weitere unabhängige Variable auf Entwicklung der Augenstrukturen zu reproduzieren, ergab aber kein auswertbares Ergebnis. Leider war es auch nicht möglich einen Vergleich zwischen dem rechten und linken Auge darzustellen, aufgrund fehlender oder nicht auswertbarer

5. DISKUSSION

Präparate. Eine Reproduzierbarkeit vor allem Bezugnehmend auf die Vorgängerstudie von Schneeganß (2018) erweist sich daher als schwierig.

In der Literatur werden die entstandenen Veränderungen der Augenstrukturen bei der Masthähnchenhaltung unter verminderten Lichtintensitäten unter dem Begriff "dim light-induced macrophthalmos" zusammengefasst. Die Augenveränderungen sind hauptsächlich ein größerer Durchmesser des Bulbus und des Glaskörpers (Deep et al., 2013; Deep et al., 2010; Harrison et al., 1968; Lauber and Kinnear, 1979; Osol et al., 1986; Weise, 2007; Whitley et al., 1869), die Schneeganß (2018) nachweisen konnte, was Einfluss auf die Reduktion der Korneadicke in der vorliegenden Studie haben könnte. Andere Strukturen sind nicht herangezogen wurden und Schneeganß (2018) konnte keine deutliche Darstellung der Kornea mittels dreidimensionaler Sonographie erzielen.

Die angewandte Methodik zur Vermessung der Korneadicke mit der genutzten Software „Stereo Investigator“ wird häufig in der Neurowissenschaft sowie in anderen medizinischen Kontexten für stereologische Analysen eingesetzt. Diese Software ermöglicht die quantitative Analyse von Gewebeschnitten, insbesondere im Zusammenhang mit der Analyse von Zellen. „Quick Measure Line“ dient dabei als Werkzeug zur präzisen

5. DISKUSSION

Längenmessung auf Gewebeschnitten. In der hier vorliegenden Studie wurden die Präparate mit einer 10-fachen Gesamtvergrößerung dargestellt und von nasal nach temporal mittels 20 Messpunkten im Ansatz eines 90 ° Winkels vom vorderen bis hinteren Hornhautepithel mittels des Werkzeuges „Quick Measure Line“ vermessen. Mögliche Messfehler oder Ausreißer wie an Tag 21, 31 und 41 könnten bei der Datenerhebung auf menschliche Faktoren wie individuelle Leistung, Tagesverfassung oder ähnliches zurückzuführen sein, denn eine Überprüfung einer weiteren Person hat nicht stattgefunden. Allerdings wurde auf eine strikte Einhaltung der Messgrenzen geachtet. Allerdings könnten die Ausreißer womöglich auch mit dem unterschiedlich entwickeltem Gewicht oder Größe des Tieres zusammenhängen, die sich auf die Entwicklung der Augen ausüben können (Olanrewaju et al., 2015). Dafür war eine eindeutige Darstellung der Korneaschichten wichtig. Allerdings können entstandene Sphärische Aberrationen durch die Darstellung der Präparate vom eingesetzten Lichtmikroskop nicht ausgeschlossen werden, denn leichte Unschärfen bei der Bildgebung waren gegeben (Linnemann and Kühl, 2018).

5.4 Tierschutzrelevanz

Die vorliegenden Ergebnisse und Auswertungen sollen tierschutzrelevante Parameter im Zusammenhang mit der Kunstlichtbeleuchtung bewerten und spezifisch untersuchen, ob die Lichtintensität einen tierschutzrelevanten Einfluss auf die Korneadicke von Masthähnchen hat und somit indirekt das Wohlbefinden von Masthähnchen beeinflussen kann.

In der Versuchsgruppe, die unter Bedingungen mit reduzierter Lichtintensität gehalten wurde, wurde eine Abnahme der Korneadicke im Vergleich zur Kontrollgruppe von rund 13 % festgestellt. Diese Befunde können, wie in der Literatur beschrieben, auf einen „dim light-induced macrophthalmos“ hinweisen (Deep et al., 2013; Deep et al., 2010; Harrison et al., 1968; Lauber and Kinnear, 1979; Osol et al., 1986). Denn Untersuchungen zeigten eine vermehrte Ansammlung von Flüssigkeit im Glaskörper, die zur Abflachung der Hornhaut führte (Lauber et al., 1961). Dadurch kann sich eine Kurzsichtigkeit (Myopie) ausbilden (Blatchford et al., 2009; Harrison et al., 1968; Jenkins et al., 1979; Lauber, 1987; Olanrewaju et al., 2015; Rault et al., 2017; Schneeganß, 2018).

Nach Schneeganß (2018) konnte kein schmerzhafter Zustand der Masthähnchen nach klinischer und ophthalmologischer Untersuchung festgestellt werden, da es weder zu einer

5. DISKUSSION

Erhöhung des Augeninnendrucks noch zum Vorliegen eines Glaukoms kam. Zudem wurden in dieser vorliegenden Studie keine Untersuchungen in Hinsicht auf den dioptrischen Apparat sowie weiterer Strukturen der Augen, die wichtig für den Sehsinn sind, wie z.B. die Retina durchgeführt, da veränderte Druckverhältnisse zu Schädigungen des Sehnervs führen können (Deep et al., 2010).

In der Studie von Schmidt (2020) wurden unter dem diskontinuierlichen Beleuchtungsprogramm positive tierschutzrelevante Veränderungen festgestellt. Diese umfassen eine Erhöhung des Schlachtkörpergewichts, eine geringere Gesamtmortalität sowie das Fehlen von Verkratzungen. Jedoch wurde auch eine höhere Prävalenz von Pododermatitis beobachtet. Weitere Studien zur Bewertung der Tierschutzrelevanz bei der Haltung von Masthähnchen unter verschiedenen Lichtbedingungen zeigten zwar Veränderungen der Augenstrukturen, jedoch keinen Unterschied im Wohlbefinden der Tiere. Es wurde festgestellt, dass die Skelett- und Sohlenballengesundheit sich unter Haltungen mit einer Lichtintensität von 5 Lux verbesserte (Blatchford et al., 2009; Deep et al., 2010; Kristensen et al., 2004; Olanrewaju et al., 2015; Rault et al., 2017; Weise, 2007).

Die Kornea verleiht dem Augapfel Stabilität, ist widerständig gegen den Augeninnendruck und hat eine Schutzfunktion

5. DISKUSSION

gegen äußere Einflüsse (Reese et al., 2016). Bei einem Verlust dieser Eigenschaften kann die Sehschärfe beeinträchtigt werden (Blatchford et al., 2009; Lauber, 1987). Die Bildung eines Glaukoms beschreibt einen pathologisch erhöhten Druck im Inneren des Auges und kann starke Schmerzen verursachen (Miller, 2018). Die Orientierung der Vögel erfolgt primär visuell (Duke-Elder, 1958) und ist daher für diese Spezies unabdingbar. Wildhühner bevorzugen eine Lebensweise in Biotopen und sind Fluchttiere, daher sind sie auf ihren Visus angewiesen, um Gefahren frühzeitig zu erkennen (Siegmann and Neumann, 2011).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie eine Reduktion der Korneadicke, aber ohne weitere Betrachtung auf morphologische Veränderungen der einzelnen Korneaschichten. Inwieweit die Lichtintensität in der Masthähnchenhaltung Einfluss auf weitere Augenstrukturen und das Wohlbefinden der Tiere hat, muss in weiteren Studien untersucht werden, insbesondere in Hinsicht auf den Einfluss der Lichtqualität, um somit eine eventuelle Anpassung und Erweiterung der aktuellen Lichtanforderungen in den gesetzlichen Rahmbedingungen zu ermöglichen und rechtfertigen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, ob ein diskontinuierliches Beleuchtungsprogramm mit einer Lichtintensitätsreduktion auf 5 Lux die Entwicklung der Korneadicke bei Masthähnchenaugen beeinflussen kann. Dies wurde durch lichtmikroskopische Untersuchungen mit der Darstellung morphologischer Strukturen und der Vermessung der Korneadicke nachgewiesen.

Der Versuchsaufbau erstreckte sich über den Zeitraum von Juni bis September 2016 und umfasste insgesamt 200 Masthähnchen der Linie Ross 308. Es wurden zwei Mastdurchgänge durchgeführt, bei denen insgesamt 34.700 Masthähnchen mit verschiedenen Beleuchtungsprogrammen gehalten wurden. Das Beleuchtungsprogramm entsprach den gesetzlich vorgeschriebenen 20 Lux für sowohl Kontroll- als auch Versuchstiere bis zum 10. Lebenstag. Danach erfolgte eine stufenweise Reduktion der Lichtintensität auf 5 Lux für die Versuchstiere, die sich am 18. Lebenstag einstellte und bis zum Mastende anhielt. Die Intervalle der Licht- und Dunkelphasen waren für beide Gruppen identisch. Die Entnahme der Kontroll- und Versuchstiere aus dem Stall erfolgte zu festgelegten Zeitpunkten (Tag 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30 und 40) während des Mastdurchganges, wobei jeweils 10 Tiere pro Tag

6. ZUSAMMENFASSUNG

entnommen wurden. An diesen Tagen wurden verschiedene Untersuchungen an den Tieren und deren Augen durchgeführt, einschließlich klinischer, ophthalmologischer und sonographischer Untersuchungen, wie sie bereits in der vorangegangenen Studie von Schneeganß (2018) beschrieben wurde.

An diesen Tagen wurden verschiedene Untersuchungen an den Tieren und deren Augen in der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische in Oberschleißheim durchgeführt, darunter klinische, ophthalmologische und sonographische Untersuchungen gemäß den Methoden, wie sie bereits in der vorangegangenen Studie von Schneeganß (2018) beschrieben wurden. Nach erfolgreichen Untersuchungen wurden die Masthähnchen tierschutzgerecht euthanasiert und ihre Augen enukleiert, der Korneadurchmesser manuell vermessen sowie zur weiteren Verarbeitung zu histologischen Präparaten asserviert. Eine vollständige Anfertigung der histologischen Präparate sowie die Vermessung der Korneadicke erfolgten in den Jahren 2018-2022.

Die Abnahme der Korneadicke konnte mittels der Azanfärbung und lichtmikroskopischer Untersuchung nachgewiesen werden und eine signifikante Beziehung mittels der geringen Anzahl an vorliegenden Daten zwischen der diskontinuierlichen Lichtintensität und der beobachteten Abnahme der Korneadicke

6. ZUSAMMENFASSUNG

nachgewiesen werden. Angesichts der Komplexität und der hohen Anforderungen bei der Herstellung von histologischen Präparaten ist es unerlässlich, dass zukünftige Studien präzisere Methoden untersuchen, um diesen Trend zu bestätigen. Zusätzlich müssen weitere potenzielle Einflussfaktoren wie Lichtqualität, genetische Komponenten, spezifische Umweltfaktoren (wie Luftfeuchtigkeit, Temperatur, Einstreu und Stallbedingungen) sowie Ernährungs- und gesundheitliche Komponenten berücksichtigt werden. Ein vertieftes Verständnis dieser Faktoren könnte dazu beitragen, die Mechanismen hinter der beobachteten Abnahme der Korneadicke besser zu verstehen und möglicherweise präzisere Empfehlungen für die zukünftige Forschung abzuleiten.

Zusammenfassend kann unter Berücksichtigung der vorliegenden Untersuchungsdaten festgestellt werden, dass:

1. Eine auch gesicherte statistische Zuordnung der Befunde in den verschiedenen Versuchsgruppen zu möglichen lichtinduzierten Veränderungen aufgrund der geschilderten fixations- und teilweise morphologisch bedingten Einflüssen nicht möglich ist und
2. Die histologische Darstellung der kornealen Strukturen als Grundlage zur Bewertung von klinisch erhobenen mittels dreidimensionaler Sonographie erhobenen Befunden an der

6. ZUSAMMENFASSUNG

Kornea von Hühnern auch aufgrund der grundsätzlich unterschiedlichen Darstellungsweise kaum als Evaluierungsgrundlage geeignet ist.

Daher sind weitergehende Untersuchungen notwendig, um eine geeignetere Methode darzustellen.

7. SUMMARY

The aim of this study was to investigate the demonstration of potential avia a discontinuous lighting program from 20 Lux – as legally mandatory – with a reduction in light intensity to 5 Lux unduced corneal alteratins with a reduction of the corneal thickness in broiler chicken eyes. This was demonstrated through light microscopic examinations, depicting morphological structures, and measuring corneal thickness.

The experimental setup spanned from June to September 2016 and included a total of 200 broiler chickens of the Ross 308 line. Two rearing periods were conducted, housing a total of 34,700 broiler chickens with different lighting programs. The lighting program corresponded to the legally required 20 lux for both control and experimental animals up to day 10 of life. Subsequently, there was a gradual reduction in light intensity to 5 lux for the experimental animals, starting on day 18 of life and continuing until the end of the rearing period. The intervals of light and dark phases were identical for both groups. The collection of control and experimental animals from the barn occurred at specified time points (days 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, and 40) during the rearing period, with 10 animals being collected per day. On these days, various examinations were conducted on the animals and their eyes, including clinical,

7. SUMMARY

ophthalmological, and sonographic examinations, as described in the previous study by Schneeganß (2018).

Various examinations were performed on the animals and their eyes at the Clinic for Birds, Small Mammals, Reptiles, and Ornamental Fish in Oberschleißheim on these days, including clinical, ophthalmological, and sonographic examinations, according to the methods described in the previous study by Schneeganß (2018). After successful examinations, the broiler chickens were euthanized in accordance with animal welfare regulations, and their eyes were enucleated. The corneal diameter was manually measured, and the eyes were further processed into histological specimens. A complete preparation of the histological specimens and measurement of corneal thickness were carried out in the years 2018-2022.

The decrease in corneal thickness was demonstrated through Azan staining and light microscopic examination, and a significant relationship was demonstrated between the discontinuous light intensity and the observed decrease in corneal thickness based on the limited data available. Given the complexity and high demands of preparing histological specimens, it is essential for future studies to investigate more precise methods to confirm this trend. Additionally, further potential influencing factors such as light quality, genetic components, specific environmental factors (such as humidity,

temperature, bedding, and barn conditions), as well as nutritional and health-related components, must be considered. A deeper understanding of these factors could help to better understand the mechanisms behind the observed decrease in corneal thickness and potentially derive more precise recommendations for future research.

In summary, considering the available study data:

1. A statistically secured assignment of the findings in the different experimental groups to possible light-induced changes due to the described fixation- and partially morphologically-related influences is not possible, and
2. The histological representation of corneal structures as a basis for evaluating clinically obtained findings on corneal sonography of chickens, also due to the fundamentally different representation methods, is hardly suitable as an evaluation basis.

Further investigations are therefore necessary to present a more suitable method.

.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Appleby, M.C., Hughes, B.O., Elson, H.A., 1992. Poultry Production Systems: Behaviour, Management and Welfare. CAB international, Wallingford.
- Bezzel, E., 1990. Ornithologie. Ulmer, Stuttgart.
- Blatchford, R.A., Archer, G.S., Mench, J.A., 2012. Contrast in light intensity, rather than day length, influences the behavior and health of broiler chickens. Poultry Science 91, 1768-1774.
- 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. Poultry Science 88, 20-28.
- Bohnet, N.E., 2007. Augenuntersuchung beim Vogel. Vet.med.Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Childow, 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 fixatives. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 59, 884-898.
- Chiu, P.S., Lauber, J.K., Kinnear, A., 1975. Dimensional and physiological lesions in the chick eye as influenced by the light environment. Experimental Biology and Medicine 148, 1223-1228.
- Davis, N.J., Prescott, N.B., Savory, C.J., Wathes, C.M., 1999. Preferences of growing fowls for different light intensities in relation to age, strain and behaviour. Animal Welfare 8, 193-203.
- Deep, A., Raginski, C., Schwan-Lardner, K., Fancher, B., Classen, H., 2013. Minimum light intensity threshold to prevent

8. LITERATURVERZEICHNIS

negative effects on broiler production and welfare. *British poultry science* 54, 686-694.

Deep, A., Schwan-Lardner, K., Crowe, T., Fancher, B., Classen, H., 2010. Effect of light intensity on broiler production, processing characteristics, and welfare. *Poultry Science* 89, 2326-2333.

Dorobeck, K., 2013. Dreidimensionale Sonographie am Vogelauge - das vordere Augensegment. *Vet.med.Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität, München.*

Duke-Elder, S.S., 1958. *System of ophthalmology* Vol Vol. 1. St. Louis, Mosby.

Evans, H.E., Martin, G.R., 1993. Organa sensuum (Organa sensoria), In: Baumel, J.J., King, A.S., Breazile, J.E., Evans, H.E., Vanden Berge, J.C. (Eds.) *Handbook of avian anatomy: Nomina anatomica avium* Cambridge, Massachusetts, pp. 585-611.

Fletcher, O.J., 2008. *Avian Histopathology*, Vol 3. American Association of Avian Pathologists, Florida.

Frankelson, E., Lauber, J., Boyd, T., 1969. The role of angle closure in light induced avian glaucoma *Canadian Journal of Ophthalmology* 4, 59-63.

Frewein, J., Sinowatz, F., 2004. Sinnesorgane, In: Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E. (Eds.) *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band V: Anatomie der Vögel*. Parey, Berlin, Hamburg.

Glasser, A., Murphy, C.J., Troilo, D., Howland, H.C., 1995. The mechanism of lenticular accommodation in chicks *Vision Research* 35, 1525-1540.

Glasser, A., Troilo, D., Howland, H.C., 1994. The mechanism of corneal accommodation in chicks. *Vision Research* 34, 1549-1566.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Gratta, F., Cabrol, M.B., Xiccato, G., Birolo, M., Bordignon, F., Trocino, A., 2023. Effect of light restriction on productive results and behavior of broiler chickens. *Poultry Science* 102.
- Grieve, K., Georgeon, C., Andreiuolo, F., Borderie, M., Ghoubay, D., Rault, J., Borderie, V., 2016. Imaging Microscopic Features of Keratoconic Corneal Morphology. *Cornea* 35, 1621-1630.
- Hagen, E., 2020. Validierung von OCT-Befunden am hinteren Augensegment von Greifvögeln mittels Konfokalmikroskopie. *Vet.med.Dissertation*. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Harrison, P., Bercovitz, A., Leary, G., 1968. Development of eye enlargement of domestic fowl subjected to low intensity light. *International Journal of biometeorology* 12, 351-358.
- Hovakimyan, M., Guthoff, R., Knappe, S., Zhivov, A., Wree, A., Krüger, A., Heisterkamp, A., Stachs, O., 2011. Short-Term Corneal Response to Cross-Linking in Rabbit Eyes Assessed by In Vivo Confocal Laser Scanning Microscopy and Histology. *Cornea* 30, 196-203.
- Jenkins, R.L., Ivey, W.D., McDaniel, G.R., Alber, R.A., 1979. A Darkness Induced Eye Abnormality in the Domestic Chicken. *Poultry Science* 58, 55-59.
- Jensen, L.S., Matson, W.E., 1957. Enlargement of avian eye by subjecting chicks to continuous incandescent illumination. *Science (New York)* 125, 741.
- Jester, J.V., Budge, A., Fisher, S., Huang, J., 2005. Corneal keratocytes: Phenotypic and species differences in abundant protein expression and in vitro light-scattering. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46, 2369-2378.
- Kang, S.W., Christensen, K.D., Kidd, J.M.T., Orlowski, S.K., Clark, J., 2023. Effects of a variable light intensity, lighting program on the welfare and performance of commercial broiler chickens. *Avian Physiology* 14-2023.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Korbel, R., 1994. Augenkrankheiten bei Vögeln: Ätiologie und Klinik von Augenkrankheiten, Luftsack-Perfusionsanästhesie, ophthalmologische Photographie und Bildatlas der Augenkrankheiten bei Vögeln. Vet.Habilitation. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Korbel, R., 2001. Das ophthalmologische Quiz - Linsenluxationen bei Eulen. Tierärztliche Praxis 29, 264-269.
- Korbel, R., 2023. Ophthalmologie bei Sauropsiden (Vögel&Reptilien) - Praktische Grundlagen & Durchführung. In: 33.FVO-Tagung Freiburg.
- Kristensen, H.H., Aerts, J.M., Leroy, T., Berckmanns, D., Wathes, C.M., 2004. Using light to control activity in broiler chickens. British poultry science 45, 30-31.
- Latendresse, J.R., Warbritton, 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, 524-533.
- Lauber, J.K., 1982. Diurnal mitochondrial changes in avian retinal pigment epithelium: a search for correlation with thyroid state. Current Eye Research 2, 863-868.
- Lauber, J.K., 1987. Review: Light-Induced Avian Glaucoma as an Animal Model for Human Primary Glaucoma. Journal of Ocular Pharmacology 3.
- Lauber, J.K., Kinnear, A., 1979. Eye enlargement in birds induced by dim light. Canadian Journal of Ophthalmology 14, 265-269.
- Lauber, J.K., McGinnis, J., 1966. Eye lesions in domestic fowl reared under continuous light. Vision Research 6, 619-626.
- Lauber, J.K., McGinnis, J., Boyd, J., 1965. Influence of Miotics, Diamox and Vision Occluders on Light-Induced Buphthalmos

8. LITERATURVERZEICHNIS

- in Domestic Fowl. *Experimental Biology and Medicine* 120, 572-575.
- Lauber, J.K., Oishi, T., Vriend, J., 1986. Plasma melatonin rhythm lost in preglaucomatous chicks. *Journal of Ocular Pharmacology* 2, 205-213.
- Lauber, J.K., Shutze, J.V., McGinnis, J., 1961. Effects of Exposure to Continuous Light on the Eye of the Growing Chick. *Experimental Biology and Medicine* 106, 871-872.
- Layton, C., Bancroft, J.D., Suvarna, S.K., 2019. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques - Fixation of tissue*, 8 Edition. Elsevier, UK.
- Lewis, P., Morris, T., 2000. Poultry and coloured light. *World's Poultry Science Journal* 56, 189-207.
- Linnemann, A., Kühl, S., 2018. *Grundlagen der Licht- und Elektronenmikroskopie* Eugen Ulmer Stuttgart, Stuttgart.
- Martin, G.R., 1985. Eye, In: King, A., J., M. (Eds.) *In form and function in birds* Academic Press, London, pp. 311-373.
- Mickay, 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.
- Miller, P.E., 2018. *Slatter's Fundamentals of veterinary ophthalmology* Vol 6th Edition. Elsevier, Missouri.
- Mulisch, M., Welsch, U., 2015. *Romeis Mikroskopische Technik* Vol 19. Springer Spektrum Heidelberg.
- Newberry, R.C., Hunt, J.R., Gardiner, E.E., 1985. Effect of Alternating Lights and Strain on Behavior and Leg Disorders of Roaster Chickens. *Poultry Science* 64, 1863-1868.
- Nickla, D., Wildsoet, C., Wallmann, J., 1998a. The circadian rhythm in intraocular pressure and its relation diurnal ocular growth changes in chicks. *Experimental Eye Research* 66, 183-193.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Nickla, D., Wildsoet, C., Wallmann, J., 1998b. Visual influences on diurnal rhythms in ocular length and choroidal thickness in chick eyes *Experimental Eye Research* 66, 163-181.
- Nickla, D.L., 2013. Ocular diurnal rhythms and eye growth regulation: Where we are 50 years after Laube. *Experimental Eye Research* 114, 25-34.
- Nickla, D.L., Jordan, K., Yang, J., Totonelly, K., 2017. Brief hyperopic defocus or form deprivation have varying effects on eye growth and ocular rhythms depending on the time-of-day of exposure. *Experimental Eye Research* 161, 132-142.
- Nickla, D.L., Totonelly, K., 2016. Brief light exposure at night disrupts the circadian rhythms in eye growth and choroidal thickness in chicks. *Experimental Eye Research* 146, 189-195.
- Oishi, T., Murakami, N., 1985. Effects of duration and intensity of illumination on several parameters of the chick eye. *Comparative Biochemistry and Physiology* 81A, 319-323.
- Olanrewaju, H., Miller, W., Maslin, W., Collier, S.D., Purswell, J.L., Branton, S., 2015. Influence of photoperiod, light intensity and their interaction on health indices of modern broilers grown to heavy weights. *International Journal of Poultry Science* 14, 183-190.
- Olanrewaju, H., Thaxton, J., Dozier, W., Purswell, J., Roush, W., Branton, S., 2006. A Review of Lighting Programs for Broiler Production. *International Journal of Poultry Science* 5, 301-308.
- Osol, G., Schwartz, B., Foss, D.C., 1986. The effects of photoperiod and lid suture on eye growth in chickens. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 27, 255-260.
- Rault, J.-L., Clark, K., Groves, P.J., Cronin, G.M., 2017. ANIMAL WELL-BEING AND BEHAVIOR, Light intensity of 5 or 20 lux on broiler behavior, welfare and productivity. *Poultry Science* 96, 779-787.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Ravelhofer, K., 1996. Pathologisch-anatomische Untersuchungen an Augen verschiedener Vogelspezies. Vet.med.Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität,
- Reese, S., Korbelt, R., Liebich, H.G., 2016. Avian Anatomy Textbook and Colour Atlas, 2nd Edition. 5m Publishing, Sheffield.
- Saby, J.A., Sigler, R.E., Stever, K., 1991. Comparison of Fixatives for Histologic Evaluation of the Canine Eye. Journal of Histotechnology 14, 251-255.
- Saunders, L.Z., Jubb, K.V., 1961. Notes on Technique for Postmortem Examination of the Eye The Canadian Veterinary Journal 2, 123-129.
- Saunders, L.Z., Rubin, L.F., 1975. Postmortem Technique. In Ophthalmologic pathology of animals, 244-253.
- Schaeffel, F., Howland, H.C., 1987. Corneal accommodation in chick and pigeon. Journal of Comparative Physiology 160, No.3, 375-384.
- Schmidt, P.S.A., 2020. Vergleichende Untersuchungen über Produktions- und Tierschutzparameter bei Masthühnern bei Haltung unter einem konstanten und einem diskontinuierlichen Lichtintensitätsprogramm. Vet.med.Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Schneegans, A., 2018. Dreidimensionale Sonographie am Masthähnchenauge unter diskontinuierlichen Beleuchtungsbedingungen. Vet.med.Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Seidel, B., 1988. Augenkrankheiten der Vögel, In: Augenkrankheiten der Haustiere. Enke, Stuttgart, pp. 237-261.
- Siegmann, O., Neumann, U., 2011. Kompendium der Geflügelkrankheiten, Vol 7. Schlütersche, Hannover.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Sinowatz, F., 2019. Histologie in der Tiermedizin: Grundlagen, Techniken, Präparate. Schlütersche, Hannover.
- Sivak, J.G., Hildebrand, T., Lebert, C., 1985. Magnitude and rate of accommodation in diving and nondiving birds. *Vision Research* 25, No.7, 925-933.
- 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, 351-459.
- Smith, M.E., Becker, B., Podos, S., 1969. Light-induced angle-closure glaucoma in the domestic fowl. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 8, 213-221.
- Tiedemann, F.T., 1810. Anatomie und Naturgeschichte der Vögel, Vol 1. Mohr, Zimmer, Heidelberg, 311-373 pp.
- Velasco Gallego, M.L., 2015. Imaging of physiological retinal structures in various raptor species using optical coherence tomography (OCT). *Vet.med.Dissertation*. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Walls, G.L., 1942. The vertebrate eye and its adaptive radiation. Bloomfield Hills, Cranbrook Institute of Science.
- Walther, T., Walther, H., 1999. Was ist Licht? Von der klassischen Optik zur Quantenoptik. C.H.Beck'sche Verlagsbuchhandlung, München.
- Weeks, C.A., Butterworth, A., 2004. Light, In: Prescott, N.B., Kristensen, H.H., Wathes, C.M. (Eds.) *Measuring and Auditing Broiler Welfare*. CAB international, Oxfordshire, UK, pp. 101-106.
- Weise, H., 2007. Lichtbedingte Einflüsse auf Verhalten und Leistung in der Hähnchenmast. *Vet.med.Dissertation*. Ludwig-Maximilians-Universität-München München

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Welsch, U., Deller, T., 2010. Präparate für die Mikroskopie, Interpretation histologischer Schnittpräparate In: Lehrbuch Histologie Urban&Fischer, München, pp. 3-16.
- Werther, K., Hufen, H., Strobel, B.K., Stein, K., Korbel, R., 2011. Effects of formalin fixation on avian eye. 11th European AAV Conference 1st ECZM Meeting. Ed. EAAV, Madrid Spain.
- Whitley, R.D., Albert, R., Brewer, R.N., McDaniel, G.R., Pidgeon, G.L., Mora, E., 1869. Photoinduced Buphthalmic Avian Eyes: II. Continuous Darkness. Poultry Science 64, 1869-1874.
- Yanoff, M., Zimmermann, L.E., Fine, B.S., 1965. Glutaraldehyde Fixation of Whole Eyes. American journal of clinical pathology 44, 167-171.

9. ANHANG

Tabelle 13: Messwerte Korneadicke (in μm) OS-KT

Tier	2	3	5	9	33	34	40	70	90
MW 1	143,8	141,9	145,8	144	153,9	156,3	154,8	149,4	154,8
MW 2	143,1	141,6	144,3	142,2	151,9	154,8	152,6	147,3	150,3
MW 3	138,3	139,1	142,9	141,6	149,3	150,2	151	146	151,2
MW 4	135,8	138,5	142,4	139,8	147,7	148,9	152,7	147,1	149,6
MW 5	133,1	137,4	140,5	140,9	145,9	147,2	149,8	144,3	148,8
MW 6	128,9	137,5	139,7	138,5	144,4	148,3	146,9	145,9	148,8
MW 7	124,2	139,2	138,3	137,4	146,2	147,9	144,8	143,7	146,9
MW 8	121,5	141,9	138	139,8	143,5	147,1	143,5	142,8	143,9
MW 9	125,7	139,1	138,4	141,3	144,3	146,8	141,1	142,2	144,2
MW 10	127	141,2	137,8	141,7	145,8	148,7	142,3	140,3	142,9
MW 11	129,1	141,3	139,6	139,6	145,9	147,6	144,9	139,8	143,7
MW 12	127,9	139,5	140,2	140	148,4	148	145,8	139,6	145,8
MW 13	130,9	138	140,8	140,2	148,4	149,2	146,9	141,5	145,2
MW 14	135,1	137,9	138,2	138,4	146,9	147,9	147,3	143,9	146,6
MW 15	139,6	138	140,3	139,2	148,1	148,3	148,9	145,3	149,9
MW 16	140,6	140,6	141,7	140,7	147	149,6	150	148,8	151,4
MW 17	140,1	140,9	142,3	142,8	147,6	151,4	152,6	149,1	149,6
MW 18	142,9	141,1	144	142,3	149,7	152,9	153,2	149,9	152,9
MW 19	144,6	141,2	143,6	143,8	152,2	156,3	153,5	150,1	153,5
MW 20	144,9	142,5	146,9	145,6	154,3	157,1	154,2	151,2	154,6

9. ANHANG

Tabelle 14: Messwerte Korneadicke (in μm) OD-KT

1	3	8	9	36	37	38	59	65	86	87
152,7	148,5	156,7	145,6	145,3	150,4	153,6	146,2	151,7	138,5	146,8
150,6	148,2	154,3	145,3	147,5	149,5	150,8	145,3	148,3	138,3	144,6
148,2	146,7	155,4	144,7	145,8	150,2	149,6	144,9	147,2	137,4	143,3
148,3	147,3	152,9	142,8	143,6	148,7	148,7	143,7	147,5	136,9	143,1
146,7	145,2	149,3	140,5	143	146,9	149,1	144,1	146,8	136	142,9
146	144,8	147,6	138,7	143,5	145,3	147,6	144	145,9	134,7	145
145,8	143,8	145,9	140,3	144,9	146,2	145,2	140,9	147,8	134,7	143,7
145,8	143,2	146,1	141,7	142,7	142,3	146,4	139,6	145,3	132,4	143,5
143,1	140	145,4	138,9	142,5	144,8	145,4	141,8	143,6	135,9	142,6
144,6	142,5	144,6	137,5	141,1	145,9	145,6	139,8	144,9	137,2	140,9
143,7	141,9	147,7	139,2	139,6	143,7	146,8	140,5	140,7	138,1	137,5
145,8	142,6	150,2	142,6	140,9	146	147,9	143,7	142,6	135,3	139,4
144,8	141,6	148,6	142,9	142,8	144,3	148,5	144,7	141,8	136,4	141,6
146,7	143,7	149,3	142,7	143,6	146,1	148,6	143,2	143,8	135,3	142,8
147,3	144,1	151,8	143,5	143,7	145,7	150,8	142,1	145,6	136,7	142,6
147	145,6	153,5	144,9	144,2	147,6	149,6	144,4	148,7	135,9	144,7
148,4	146,8	150,3	144,9	144,4	149,1	152,7	144,5	149,9	136,7	143,9
150,9	148,2	151,6	143	146,8	148,6	154,1	146,8	153	138,1	145,1
152,7	147,9	152	145,6	146,3	150,2	153,4	146,3	152,6	137,8	144,9
154,6	148,6	154,8	147,9	147,8	150,9	155,6	147,1	153,4	139,7	145,8

9. ANHANG

Tabelle 15: Messwerte Korneadicke in μm) OS-VT

103	112	113	116	117	118	119	124	128	134
146	146,3	148,8	156,2	150,2	147,3	150	140,9	139,4	153,7
144,3	144,4	147,5	155	146,9	145,5	148,2	137,9	139,3	152,6
143,6	143,9	141,9	152,3	145,3	142,5	146,1	137,1	136	148
139,4	142,5	142,1	150,5	144,3	140,3	144,9	134	134,4	148
139,4	143,3	143,3	149,1	143,3	139	142,5	136,6	129,5	146,7
136,6	142,8	138,5	149,3	141,3	138	142,3	133,5	130,8	144,2
135	141,4	135,7	148	142,5	138	142,6	131,7	128	144,3
134,3	140,6	135,5	147,4	144,2	139,8	143,7	132,6	127,1	142,2
136,9	142	136,6	147,1	144,6	137,7	141,7	136,6	127,4	145,3
134,2	143,5	138,4	149,3	140	136,8	144,6	131,2	125,8	145,6
136,7	143,5	136	146,7	144,1	138,6	145,7	134,7	128,2	143,9
139,1	145,9	136,7	144,3	142,3	140,8	143,7	135,3	130,5	141,7
141,7	145,9	138,9	144,9	145,1	142,9	144,8	138,5	132,7	147,7
141,9	146,3	138,7	144,1	144,7	141,8	145,7	139,2	131,2	146,2
142,7	145,5	140,9	145,1	145,8	143	146,8	139,8	135	149,5
143,5	146,6	144,4	147,7	147,9	144,8	147,6	138,5	136,2	152,9
142,7	146,7	146,9	150,9	147,8	145,2	149,7	139,7	136,5	152,4
146,5	145,7	149,3	152,7	149,9	145,5	150,6	140,6	137,8	152
145,5	146,9	149,6	153,6	150	147,5	151,4	141,4	140,7	153,6
147,1	145,7	150,1	155,1	154,2	148,4	152,7	141,3	140,3	154,8

9. ANHANG

Tabelle 16: Messwerte Korneadicke (in μm) OS-VT

135	136	137	142	165	166	167	169	171	190	200
152,3	149,3	159,7	145,8	145,9	146,4	144	143,5	131,7	103,7	115
150,3	145,4	159,9	143,5	144,3	142,2	142,1	142,3	131,4	101,7	112,8
148,7	143,7	159	143,3	143,7	139	140,9	138,4	130,2	96,8	109,4
146,6	144,7	156,1	143,5	139,8	137,5	137,1	137,9	127,3	93,7	108,8
144,1	145,9	154,5	140,6	139,9	136,8	137,4	137,5	127,1	93,4	107,2
141,6	144,6	156,4	137,7	136,8	136,9	138,1	134,7	127,7	92,2	105,6
145,6	143,9	157,6	138,6	135,9	138,3	136,9	133,2	126,3	91,9	102,4
147,6	141,9	158,5	139,9	133,8	137	135,2	130	122,9	90,8	101,4
143,4	142,6	159,5	138,3	130,3	134,8	133,7	128,2	126,2	90,5	99,8
146,3	140,7	159,3	137,2	129,7	136,3	132	127	124,6	93,7	99,6
143	139,2	158,9	135,2	131,7	139,2	129,4	128,5	128,5	94,8	96,6
146,7	138,7	156,6	136,7	132,8	141,7	129,2	127,8	124,1	94,3	97,5
144,3	142,7	154,7	135,8	133,9	138,4	132,5	131	126,6	94,6	98,8
142,2	140,2	155,7	137,7	133,4	140,7	134,9	131,3	124,8	95,3	101,4
145,9	143,9	156,1	138,5	135,9	140,2	134	132,7	123,2	94,6	106
147,9	142	158,3	140,3	136,2	142,5	136,3	135,2	124,6	95,5	107
149	143,7	161,9	140,3	137,4	143,8	138,2	135,5	127,9	98	108,9
152,8	145,6	159,6	143,3	140,9	143,6	140,1	137,9	129,2	101,2	112,9
154,4	144,5	161,3	145,5	143,5	145,2	142,2	138	131,6	100	114,6
154,2	146,8	162	145,4	145,8	147,9	145,3	143,9	131,7	102,5	114,8

9. ANHANG

Tabelle 17: Messwerte Korneadicke (in μm) OD-VT

102	107	110	113	116	123	126	136	146	163
157,6	146,4	156,7	145,8	150,3	156,4	149,3	149,9	162,9	152,4
155	145,2	153,6	143,2	149,1	154,4	147,7	148,9	163,1	149,7
153,4	143,7	152,5	142,1	148,7	152,6	147	146,3	161,9	148,3
155,3	144,1	150	138,2	146,8	149,4	145,5	145,6	159,7	148,9
152,3	142,6	153,5	136,7	143,7	147,9	148,8	144,2	158,7	146,2
150,1	141,7	151,5	137,4	144	146,7	148,3	142,1	154,7	146,3
149,7	139,8	149,5	135	142,8	147,8	145,3	141,1	157,8	144,8
147,6	137,9	146,2	137,9	140,7	145,9	143,8	139,1	156,7	143
146,7	135,9	149,2	138,4	141,9	144	142,7	142,5	151,6	143,6
148,9	134,7	150,2	139,5	143,8	145,6	140,1	142,4	152,6	141,4
149,5	134,5	152,2	141	145,6	144,3	141,8	144,3	147,1	144,2
149,2	136,4	152,8	142,9	146,7	145,6	139,3	142	149,5	145,6
147,6	138,8	152,9	143,5	145,9	146,9	139,4	140,8	149,5	147,3
148,3	140,1	154,7	142,6	144,7	147,2	141	141,2	149,7	149,5
149,9	141,7	152,6	141	143,8	148,5	142,5	142,8	150,8	149,7
152	140,9	153,7	140,1	142,9	148,2	144	142,4	152,4	150,3
153,8	142	154	143,7	143,7	148	146,7	146,8	153,6	152,7
155,4	142,5	156,4	145,7	146,8	150,7	149,2	147,2	155,9	154,2
157,6	145,2	155,3	146,3	147,5	152,3	149,6	149,3	160,9	153,5
158,1	147,6	157,5	146,8	149,6	153,8	150,8	150,4	161,8	154,2

9. ANHANG

Tabelle 18: Messwerte Korneadicke (in μm) OD-VT

164	174	175	187	188	190	191	193	194	198	199
148,8	97,6	102,3	116,3	111,5	125,7	123	108,3	107,2	135,4	134,1
149,3	93,9	98,8	114,5	109,5	124,7	122,1	101,1	105,6	129,2	128,8
147,8	90,8	97,2	111,8	108,4	123,3	118,6	99,6	103,4	120,8	123,7
145,4	89,2	96,8	111,8	105,4	119,3	116,5	102,2	105	120,5	122
145,3	86,9	95	113,7	102,2	118,8	111,2	101,8	103,9	115	114,3
142,2	85,6	94,8	113,1	100,3	119,3	109,6	103,1	97,9	120,6	114,7
142	81,7	94,3	107,4	100,1	114,3	106	101,6	96,7	114	112,2
144,9	81,3	93,7	104,2	98,3	113,6	110,2	108,3	101,4	112,9	108,7
146,2	80,9	92	100,4	96,6	106,1	108,3	102,4	99	113,6	110,9
143,8	83	91,5	100,3	97,6	109,9	107,5	102	101,6	114,9	113,6
142,8	83,3	91,5	99,9	95,9	107,7	106,5	102,3	101,2	114	114,5
142,4	83,1	91,3	97,7	94,4	108,4	109,4	104,1	103,2	118,1	117,7
143,1	87,3	94,1	98,1	95	109,2	111,3	103,7	101,8	117,7	115,6
144,8	91,7	94,9	102,4	96,7	113,7	112,9	101,6	103,7	122,6	118,8
145	93,7	95,2	103,1	98,8	116,5	115,7	103,1	101,1	122,2	121,7
145,3	94,5	97,6	103,5	102,5	114,3	116,7	105,4	102,3	123	122
146,9	95,8	99,2	106,5	105,7	119,4	118,3	106,1	104,7	122,5	125,9
146,3	96,2	100,2	110,4	106,9	122,8	122,8	105	105,8	126,2	128,8
147,2	96,4	101,1	113,6	108,6	123,3	124,6	107,8	106,1	130,5	130,1
148,4	97	102,3	115,5	112,6	124,7	125,1	109	109,9	131,6	135,4

Tabelle 19: Mittelwerte (in μm) und Standardabweichung (in μm) der Korneadicke KT

Tier/Auge	Mittelwert	Standardabweichung
2 OS	134,8	7,53
3 OS	139,2	1,67
5 OS	141,2	2,68
9 OS	140,9	2,06
33 OS	148,1	3,06
34 OS	150,2	3,38
40 OS	148,8	4,21
70 OS	145,4	3,65
90 OS	148,7	3,71
1 OD	147,7	3,15
3 OD	145,1	2,63
8 OD	150,4	3,54
9 OD	142,7	2,78
36 OD	144	2,18
37 OD	147,1	2,48
38 OD	149,5	3,08
59 OD	143,5	2,26
65 OD	147,1	3,72
86 OD	136,6	1,67
87 OD	143,2	2,18

Tabelle 20: Mittelwerte (in μm) und Standardabweichung (in μm) der Korneadicke OS-VT

Tier/Auge	Mittelwert	Standardabweichung
103 OS	140,8	4,19
112 OS	144,5	1,93
113 OS	141,9	5,16
116 OS	149,4	3,73
117 OS	145,7	3,47
118 OS	142,2	3,63
119 OS	146,2	3,26
124 OS	137,1	3,26
128 OS	133,3	4,83
134OS	148,3	4,15
135 OS	147,3	3,88
136 OS	143,5	2,61
137 OS	158,3	2,24
142 OS	140,3	3,36
165 OS	137,6	5,14
166 OS	140,4	3,64
167 OS	136,8	4,53
169 OS	134,7	5,21
171 OS	127,38	2,88
190 OS	95,9	3,95
200 OS	106,1	6,09

Tabelle 21: Mittelwerte (in μm) und Standardabweichung (in μm) der Korneadicke OD-VT

Tier/Auge	Mittelwert	Standardabweichung
102 OD	151,9	3,66
107 OD	141,1	3,82
110 OD	152,8	2,79
113 OD	141,4	3,44
116 OD	145,5	2,69
123 OD	148,8	3,48
126 OD	145,1	3,69
136 OD	144,5	3,38
146 OD	155,5	5,09
163 OD	148,3	3,88
164 OD	145,4	2,23
174 OD	89,5	5,95
175 OD	96,2	3,55
187 OD	107,2	6,32
188 OD	102,4	5,81
190 OD	116,7	6,29
191 OD	114,8	6,36
193 OD	103,9	2,73
194 OD	103,1	3,18
198 OD	121,2	6,59
199 OD	120,7	7,86

Tabelle 22: Regression Korneadicke Kontrolltiere
Messwert 1 - 11 in Abhängigkeit Tag

Term	Koef	SE Koef	95 %-KI	t-Wert	p-Wert
Konstante	149,23	1,72	145,61; 152,86	86,83	0,000
Tag	- 0,040	0,122	- 0,298; 0,218	- 0,33	0,748
Konstante	148,26	1,45	145,21; 151,31	102,58	0,000
Tag	- 0,090	0,103	- 0,307; 0,127	- 0,88	0,393
Konstante	146,53	1,58	143,19; 149,86	92,64	0,000
Tag	- 0,049	0,112	- 0,287; 0,188	- 0,44	0,666
Konstante	145,36	1,64	141,91; 148,81	88,87	0,000
Tag	- 0,023	0,116	- 0,268; 0,223	- 0,19	0,849
Konstante	143,65	1,56	140,36; 146,93	92,26	0,000
Tag	0,013	0,111	- 0,221; 0,246	0,12	0,910
Konstante	142,16	1,71	138,56; 145,77	83,15	0,000
Tag	0,080	0,122	- 0,176; 0,337	0,66	0,518
Konstante	141,52	1,87	137,57; 145,48	75,52	0,000
Tag	0,070	0,133	- 0,211; 0,351	0,53	0,604
Konstante	141,28	1,92	137,22; 145,34	73,44	0,000
Tag	0,005	0,137	- 0,284; 0,294	0,04	0,971
Konstante	140,82	1,53	137,58; 144,05	91,77	0,000
Tag	0,046	0,109	- 0,185; 0,276	0,42	0,681
Konstante	141,45	1,54	138,20; 144,70	91,90	0,000
Tag	0,001	0,109	- 0,230; 0,232	0,01	0,993
Konstante	141,97	1,43	138,95; 144,99	99,29	0,000
Tag	- 0,055	0,102	- 0,269; 0,159	- 0,54	0,595

Tabelle 23: Regression Korneadicke Kontrolltiere
Messwert 12 - 20 in Abhängigkeit Tag

Term	Koef	SE Koef	95 %-KI	t-Wert	p-Wert
Konstante	143,12	1,71	139,52; 146,73	83,82	0,000
Tag	- 0,070	0,121	- 0,326; 0,187	- 0,57	0,574
Konstante	143,27	1,52	140,06; 146,48	94,20	0,000
Tag	- 0,042	0,108	- 0,270; 0,186	- 0,39	0,703
Konstante	143,44	1,44	140,41; 146,47	99,85	0,000
Tag	- 0,022	0,102	- 0,238; 0,193	- 0,22	0,831
Konstante	144,61	1,46	141,53; 147,69	99,00	0,000
Tag	- 0,018	0,104	- 0,237; 0,201	- 0,18	0,862
Konstante	145,91	1,47	142,80; 149,01	99,21	0,000
Tag	- 0,015	0,105	- 0,235; 0,206	- 0,14	0,890
Konstante	146,79	1,47	143,68; 149,90	99,61	0,000
Tag	- 0,051	0,105	- 0,272; 0,170	- 0,48	0,635
Konstante	147,66	1,57	144,35; 150,97	94,09	0,000
Tag	- 0,007	0,112	- 0,242; 0,228	- 0,06	0,952
Konstante	148,61	1,62	145,19; 152,04	91,61	0,000
Tag	- 0,042	0,115	- 0,285; 0,201	- 0,37	0,719
Konstante	150,20	1,59	146,85; 153,56	94,46	0,000
Tag	- 0,059	0,113	- 0,297; 0,180	- 0,52	0,610

Tabelle 24: Regression Korneadicke Kontrolltiere
Messwert 1 - 11 in Abhängigkeit Lichtintensität

Term	Koef	SE Koef	95 %-KI	t-Wert	p-Wert
Konstante	149,20	1,79	145,41; 152,98	83,20	0,000
Lux x 100 h	- 0,0088	0,032	- 0,0772; 0,0596	- 0,27	0,789
Konstante	148,27	1,51	145,08; 151,46	98,09	0,000
Lux x 100 h	- 0,0221	0,0273	- 0,0798; 0,0355	- 0,81	0,429
Konstante	146,50	1,65	143,02; 149,99	88,73	0,000
Lux x 100 h	- 0,0115	0,0298	- 0,0744; 0,0515	- 0,38	0,706
Konstante	145,31	1,71	141,71; 148,91	85,17	0,000
Lux x 100 h	- 0,0043	0,0308	- 0,0693; 0,0608	- 0,14	0,892
Konstante	143,56	1,62	140,14; 146,99	88,50	0,000
Lux x 100 h	0,0052	0,0293	- 0,0566; 0,0671	0,18	0,861
Konstante	142,02	1,78	138,26; 145,77	79,89	0,000
Lux x 100 h	0,0232	0,0321	- 0,0445; 0,0910	0,72	0,479
Konstante	141,38	1,95	137,26; 145,49	72,52	0,000
Lux x 100 h	0,0208	0,0352	- 0,0535; 0,0952	0,59	0,562
Konstante	141,21	2,01	136,98; 145,44	70,42	0,000
Lux x 100 h	0,0029	0,0362	- 0,0735; 0,0794	0,08	0,936
Konstante	140,71	1,60	137,34; 144,08	88,11	0,000
Lux x 100 h	0,0138	0,0289	- 0,0471; 0,0747	0,48	0,639
Konstante	141,38	1,60	137,99; 144,76	88,13	0,000
Lux x 100 h	0,0020	0,0290	- 0,0591; 0,0632	0,07	0,945
Konstante	141,95	1,49	138,80; 145,10	95,08	0,000
Lux x 100 h	- 0,0130	0,0270	- 0,0700; 0,0439	- 0,48	0,635

Tabelle 25: Regression Korneadicke Kontrolltiere
Messwert 12 - 20 in Abhängigkeit Lichtintensität

Term	Koef	SE Koef	95 %-KI	t-Wert	p-Wert
Konstante	143,11	1,78	139,34; 146,87	80,25	0,000
Lux x 100 h	- 0,0166	0,0322	- 0,0846; 0,0514	- 0,51	0,614
Konstante	143,22	1,59	139,87; 146,57	90,20	0,000
Lux x 100 h	- 0,0091	0,0287	- 0,0696; 0,0514	- 0,32	0,755
Konstante	143,39	1,50	140,23; 146,55	95,68	0,000
Lux x 100 h	- 0,0040	0,0271	- 0,0612; 0,0531	- 0,15	0,884
Konstante	144,56	1,52	141,35; 147,78	94,89	0,000
Lux x 100 h	- 0,0033	0,0275	- 0,0614; 0,0548	- 0,12	0,906
Konstante	145,87	1,53	142,63; 149,10	95,12	0,000
Lux x 100 h	- 0,0026	0,0277	- 0,0611; 0,0559	- 0,09	0,926
Konstante	146,76	1,54	143,51; 150,01	95,38	0,000
Lux x 100 h	- 0,0116	0,0278	- 0,0703; 0,0470	- 0,42	0,681
Konstante	147,59	1,64	144,13; 151,04	90,21	0,000
Lux x 100 h	0,0001	0,0296	- 0,0623; 0,0625	0,00	0,997
Konstante	148,57	1,69	144,99; 152,14	87,74	0,000
Lux x 100 h	- 0,0092	0,0306	- 0,0737; 0,0554	- 0,30	0,768
Konstante	150,18	1,66	146,67; 153,68	90,44	0,000
Lux x 100 h	- 0,0137	0,0300	- 0,0770; 0,0496	- 0,46	0,654

Tabelle 26: Regression Korneadicke Versuchstiere
Messwert 1 - 11 in Abhängigkeit Tag

Term	Koef	SE Koef	95 %-KI	t-Wert	p-Wert
Konstante	153,91	2,94	147,95; 159,88	52,39	0,000
Tag	- 0,963	0,145	- 1,257; - 0,670	- 6,66	0,000
Konstante	152,47	2,95	146,49; 158,45	51,67	0,000
Tag	- 1,026	0,143	- 1,315; - 0,736	- 7,18	0,000
Konstante	150,94	2,92	145,03; 156,86	51,75	0,000
Tag	- 1,077	0,141	- 1,363; - 0,791	- 7,63	0,000
Konstante	149,29	2,91	143,39; 155,19	51,32	0,000
Tag	- 1,055	0,141	- 1,341; - 0,770	- 7,50	0,000
Konstante	149,09	2,85	143,31; 154,87	52,28	0,000
Tag	- 1,119	0,138	- 1,399; - 0,839	- 8,11	0,000
Konstante	147,44	2,91	141,55; 153,33	50,74	0,000
Tag	- 1,089	0,141	- 1,375; - 0,804	- 7,75	0,000
Konstante	147,33	2,98	141,27; 153,38	49,36	0,000
Tag	- 1,155	0,144	- 1,448; - 0,862	- 8,00	0,000
Konstante	146,36	3,01	140,26; 152,47	48,62	0,000
Tag	- 1,121	0,146	- 1,417; - 0,826	- 7,70	0,000
Konstante	146,36	3,00	140,28; 152,44	48,80	0,000
Tag	- 1,163	0,145	- 1,457; - 0,869	- 8,01	0,000
Konstante	145,79	2,99	139,73; 151,86	48,74	0,000
Tag	- 1,129	0,145	- 1,423; - 0,836	- 7,80	0,000
Konstante	146,17	2,93	140,23; 152,10	49,97	0,000
Tag	- 1,148	0,142	- 1,435; - 0,861	- 8,11	0,000

Tabelle 27: Regression Korneadicke Versuchstiere
Messwert 12 - 20 in Abhängigkeit Tag

Term	Koef	SE Koef	95 %-KI	t-Wert	p-Wert
Konstante	146,20	3,03	140,06; 152,34	48,31	0,000
Tag	- 1,120	0,146	- 1,417; - 0,823	- 7,65	0,000
Konstante	147,73	2,82	142,00; 153,45	52,32	0,000
Tag	- 1,150	0,137	- 1,427; - 0,873	- 8,42	0,000
Konstante	147,68	2,82	141,96; 153,40	52,38	0,000
Tag	- 1,093	0,136	- 1,369; - 0,816	- 8,01	0,000
Konstante	148,85	2,79	143,19; 154,52	53,32	0,000
Tag	- 1,097	0,135	- 1,371; - 0,823	- 8,12	0,000
Konstante	150,16	2,78	144,53; 155,79	54,07	0,000
Tag	- 1,096	0,134	- 1,369; - 0,824	- 8,16	0,000
Konstante	151,21	2,78	145,57; 156,84	54,42	0,000
Tag	- 1,070	0,134	- 1,342; - 0,797	- 7,96	0,000
Konstante	152,51	2,81	146,81; 158,20	54,33	0,000
Tag	- 1,042	0,136	- 1,318; - 0,767	- 7,68	0,000
Konstante	153,55	2,89	147,68; 159,42	53,06	0,000
Tag	- 1,023	0,140	- 1,307; - 0,739	- 7,31	0,000
Konstante	154,65	2,93	148,71; 160,59	52,80	0,000
Tag	- 0,993	0,142	- 1,280; - 0,706	- 7,01	0,000

Tabelle 28: Regression Korneadicke Versuchstiere
Messwert 1 - 11 in Abhängigkeit Lichtintensität

Term	Koef	SE Koef	95 %-KI	t-Wert	p-Wert
Konstante	160,09	3,91	152,15; 168,03	40,92	0,000
Lux x 100 h	- 0,4958	0,0801	- 0,6585; - 0,3332	- 6,19	0,000
Konstante	158,91	3,97	150,87; 166,96	40,07	0,000
Lux x 100 h	- 0,5253	0,0800	- 0,6877; - 0,3630	- 6,56	0,000
Konstante	157,56	3,98	149,50; 165,63	39,62	0,000
Lux x 100 h	- 0,548	0,0803	- 0,7109; - 0,3853	- 6,83	0,000
Konstante	155,93	3,92	147,98; 163,89	39,74	0,000
Lux x 100 h	- 0,5408	0,0792	- 0,7014; - 0,3801	- 6,83	0,000
Konstante	156,02	3,91	148,09; 163,94	39,91	0,000
Lux x 100 h	- 0,5707	0,0789	- 0,7307; - 0,4106	- 7,23	0,000
Konstante	154,21	3,95	146,19; 162,23	39,02	0,000
Lux x 100 h	- 0,5563	0,0798	- 0,7181; - 0,3945	- 6,97	0,000
Konstante	154,27	4,13	145,89; 162,64	37,34	0,000
Lux x 100 h	- 0,5840	0,0834	- 0,7532; - 0,4149	- 7,00	0,000
Konstante	153,33	4,09	145,02; 161,63	37,46	0,000
Lux x 100 h	- 0,5724	0,0826	- 0,7400; - 0,4048	- 6,93	0,000
Konstante	153,70	4,07	145,45; 161,96	37,76	0,000
Lux x 100 h	- 0,5965	0,0822	- 0,7632; - 0,4299	- 7,26	0,000
Konstante	153,08	4,01	144,95; 161,22	38,18	0,000
Lux x 100 h	- 0,5831	0,0809	- 0,7473; - 0,4190	- 7,20	0,000
Konstante	153,56	3,94	145,57; 161,55	38,98	0,000
Lux x 100 h	- 0,5922	0,0795	- 0,7535; - 0,4309	- 7,45	0,000

Tabelle 29: Regression Korneadicke Versuchstiere
Messwert 12 - 20 in Abhängigkeit Lichtintensität

Term	Koef	SE Koef	95 %-KI	t-Wert	p-Wert
Konstante	153,63	4,00	145,51; 161,74	38,38	0,000
Lux x 100 h	- 0,5828	0,0808	- 0,7467; - 0,4190	- 7,21	0,000
Konstante	155,21	3,80	147,50; 162,91	40,85	0,000
Lux x 100 h	- 0,5952	0,0767	- 0,7507; - 0,4396	- 7,76	0,000
Konstante	154,76	3,78	147,09; 162,43	40,92	0,000
Lux x 100 h	- 0,5648	0,0764	- 0,7197; - 0,4100	- 7,40	0,000
Konstante	156,05	3,73	148,49; 163,61	41,87	0,000
Lux x 100 h	- 0,5690	0,0752	- 0,7216; - 0,4164	- 7,56	0,000
Konstante	157,30	3,72	149,75; 164,85	42,25	0,000
Lux x 100 h	- 0,5675	0,0752	- 0,7199; - 0,4151	- 7,55	0,000
Konstante	158,12	3,73	150,56; 165,69	42,39	0,000
Lux x 100 h	- 0,5525	0,0753	- 0,7052; - 0,3998	- 7,34	0,000
Konstante	159,35	3,73	151,79; 166,92	42,72	0,000
Lux x 100 h	- 0,5410	0,0753	- 0,6937; - 0,3883	- 7,19	0,000
Konstante	160,26	3,83	152,49; 168,03	41,81	0,000
Lux x 100 h	- 0,5308	0,0774	- 0,6877; - 0,3739	- 6,86	0,000
Konstante	161,11	3,88	153,24; 168,98	41,52	0,000
Lux x 100 h	- 0,5140	0,0783	- 0,6728; - 0,3551	- 6,56	0,000

Tabelle 30: Regression Korneadurchmesser (in mm) in Abhängigkeit Masttag

Term	Koef	SE Koef	95 %-KI	t-Wert	p-Wert
Konstante	4,4084	0,0926	4,2121; 4,6047	47,61	0,000
Tag	0,09092	0,00483	0,08068; 0,10117	18,81	0,000
Konstante	4,2348	0,0880	4,0482; 4,4215	48,10	0,000
Tag	0,09147	0,00460	0,08173; 0,10121	19,91	0,000
Konstante	4,2413	0,0874	4,0560; 4,4266	48,52	0,000
Tag	0,09122	0,00456	0,08154; 0,10089	19,99	0,000
Konstante	4,0811	0,0880	3,8946; 4,2677	46,38	0,000
Tag	0,09161	0,00459	0,08188; 0,10135	19,95	0,000
Konstante	4,5521	0,0879	4,3675; 4,7367	51,80	0,000
Tag	0,09469	0,00483	0,08455; 0,10483	19,61	0,000
Konstante	4,4306	0,0837	4,2549; 4,6064-	52,96	0,000
Tag	0,09409	0,00460	0,08443; 0,10374	20,47	0,000
Konstante	4,4229	0,0837	4,2470; 4,5988	52,81	0,000
Tag	0,09455	0,00460	0,08488; 0,10422	20,55	0,000
Konstante	4,3217	0,0832	4,1470; 4,4965	51,95	0,000
Tag	0,09389	0,00457	0,08429; 0,10349	20,54	0,000

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Bulbusformen (Walls, 1942)	12
Abbildung 2: Hornhaut HE Färbung Huhn (Fletcher, 2008)16	
Abbildung 3: Hinterfläche eines rechten Auges mit Muskelansätzen, Huhn (Frewein and Sinowatz, 2004).....	29
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Lichtmikroskops (Sinowatz, 2019).....	48
Abbildung 5: Grundlagen zur histologischen Technik (Sinowatz, 2019)	57
Abbildung 6: Probleme und Artefakte bei der Schnittpräparation und ihre Abhilfe (Mulisch and Welsch, 2015)	70
Abbildung 7: Resultate einiger wichtiger histologischer Färbungen (Sinowatz, 2019).....	74
Abbildung 8: E nukleation an Versuchstag 3	92
Abbildung 9: Parazentese	92
Abbildung 10: Gewebereinbettungsautomat Spin Tissue Processor STP 120-2 (Fa. Myr® Especialidades Médicas, S.L. Spanien), Histologisches Labor Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische, Oberschleißheim.....	99
Abbildung 11: Fertiger Paraffinblock	102

184

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 12: Darstellung Korneadurchmesser von dorsal nach ventral im fixierten Zustand des Auges	120
Abbildung 13: Darstellung Korneadurchmesser von dorsal nach ventral nach Zuschnitt für die Entwässerung.....	121
Abbildung 14: Darstellung Korneadurchmesser von nasal nach temporal im fixierten Zustand des Auges	122
Abbildung 15: Darstellung Korneadurchmesser von nasal nach temporal nach Zuschnitt für die Entwässerung.....	123
Abbildung 16: Präparat 165 OS mit allen Schichten.....	126
Abbildung 17: Präparat 165 OS mit Messlinien	126
Abbildung 18: Präparat mit zeigender Stückelung der einzelnen Korneaschichten	127
Abbildung 19: Präparat mit Zusammenhangstrennung einzelner Korneastrukturen	127
Abbildung 20: Präparat mit Spaltenbildung	127
Abbildung 21: Präparat mit hochgradiger Quellung	128
Abbildung 22: Präparat mit Stückelung und Überlappung von Strukturen	128
Abbildung 23: Präparat mit schlechter Anfärbbarkeit.....	128

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 24: Darstellung Korneadicke zusammengefasst in Abhängigkeit Lichtintensität	131
Abbildung 25: Darstellung Korneadicke gesamte Messpunkte in Abhängigkeit Lichtintensität	132
Abbildung 26: Darstellung Korneadicke zusammengefasst in Abhängigkeit der Masttage	133

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Anleitungen HE-Färbung und Azanfärbung (Mulisch and Welsch, 2015)	77
Tabelle 2: Lichtintensitäten (in Lux) und Dunkelphasen (in h) während der Mastperiode (Schneeganz, 2018)	87
Tabelle 3: Verwendete Davidson-Lösung zur Parazentese und Präparationsgefäß	91
Tabelle 4: Zusammensetzung Davidson-Lösung	94
Tabelle 5: Entwässerungsprotokoll nach Velasco Gallego (2015) und genutzte Chemikalien	97
Tabelle 6: Benötigte Chemikalien Azanfärbung.....	104
Tabelle 7: Färbeprotokoll angewandter Azanfärbung nach Heidenhain.....	105
Tabelle 8: Tatsächliche Lichtintensität der Kontroll- und Versuchsgruppe in Lux. Morgen- und Abenddämmerungsperiode jeweils 30 Minuten. Lichtintensität in der Skotophase < 0,5 Lux	113
Tabelle 9: Mittelwerte der Korneadurchmesser (in mm) der einzelnen Tiergruppen OS von nasal nach temporal.....	115

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 10: Mittelwerte der Korneadurchmesser (in mm) der einzelnen Tiergruppen OS von dorsal nach ventral.....	116
Tabelle 11: Mittelwerte der Korneadurchmesser (in mm) der einzelnen Tiergruppen OD von nasal nach temporal.....	117
Tabelle 12: Mittelwerte der Korneadurchmesser (in mm) der einzelnen Tiergruppen OD von dorsal nach ventral.....	118
Tabelle 13: Messwerte Korneadicke (in μm) OS-KT.....	166
Tabelle 14: Messwerte Korneadicke (in μm) OD-KT	167
Tabelle 15: Messwerte Korneadicke in μm) OS-VT.....	168
Tabelle 16: Messwerte Korneadicke (in μm) OS-VT.....	169
Tabelle 17: Messwerte Korneadicke (in μm) OD-VT	170
Tabelle 18: Messwerte Korneadicke (in μm) OD-VT	171
Tabelle 19: Mittelwerte (in μm) und Standardabweichung (in μm) der Korneadicke KT	172
Tabelle 20: Mittelwerte (in μm) und Standardabweichung (in μm) der Korneadicke OS-VT	173
Tabelle 21: Mittelwerte (in μm) und Standardabweichung (in μm) der Korneadicke OD-VT.....	174
Tabelle 22: Regression Korneadicke Kontrolltiere Messwert 1 - 11 in Abhängigkeit Tag	175

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 23: Regression Korneadicke Kontrolltiere Messwert 12 - 20 in Abhängigkeit Tag	176
Tabelle 24: Regression Korneadicke Kontrolltiere Messwert 1 - 11 in Abhängigkeit Lichtintensität.....	177
Tabelle 25: Regression Korneadicke Kontrolltiere Messwert 12 - 20 in Abhängigkeit Lichtintensität.....	178
Tabelle 26: Regression Korneadicke Versuchstiere Messwert 1 - 11 in Abhängigkeit Tag	179
Tabelle 27: Regression Korneadicke Versuchstiere Messwert 12 - 20 in Abhängigkeit Tag	180
Tabelle 28: Regression Korneadicke Versuchstiere Messwert 1 - 11 in Abhängigkeit Lichtintensität.....	181
Tabelle 29: Regression Korneadicke Versuchstiere Messwert 12 - 20 in Abhängigkeit Lichtintensität.....	182
Tabelle 30: Regression Korneadurchmesser (in mm) in Abhängigkeit Masttag	183

10. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Korbelt für die Überlassung des interessanten Themas und der Möglichkeit tiefere Einblicke in die histologischen Arbeitsbereiche sowie den Zusammenhang „Licht und Sehen“ zu gewinnen und in ein großes Team integriert zu werden.

Ein herzlicher Dank gebührt Dr. Annika Schneegans für den Vorschlag zur Übernahme dieses Themas und die Erarbeitung meines Konzeptes, ohne sie wäre eine Durchführung nicht möglich gewesen.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Dr. Elisabeth Hagen für die fachliche und moralische Unterstützung bedanken. Mit Ihrer gewissenhaften Durchsicht und Optimismus gegenüber meiner Arbeit sowie hilfreichen Anmerkungen haben zum meinem erfolgreichen Abschluss beigetragen.

Eine Kooperation mit dem Lehrstuhl für Neuroanatomie ermöglichte mir eine adäquate Aneignung der Fähigkeiten zur Herstellung histologischer Präparate. Ein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Schmitz und allen seinen Mitarbeiterinnen aus dem Labor, insbesondere Barbara Mosler für die Bereitstellung ihres Arbeitsplatzes am Mikroskop.

10. DANKSAGUNG

Vielen Dank an alle Mitarbeiter und Doktoranden der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische, die sowohl zahlreich bei der Vorbereitung als auch bei der Durchführung beteiligt waren und mich unterstützt haben. Ein besonderer Dank gilt Miriam Schiller und Prof. Dr. Monika Rinder mit.

Zu guter Letzt ein riesiges Danke an meine Familie, ohne die alles nicht möglich gewesen wäre, vor allem meinen Eltern, meinem Ehemann Tom und meinem Bruder, der mir bei der statistischen Auswertung beratend zur Seite stand. Ihr alle habt immer an mich geglaubt, unterstützt, vor allem in den schwierigen Momenten die richtigen Worte gefunden.