

Aus der Klinik für Kleintiere
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

und

dem Veterinär-Anatomischen Institut
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Untersuchungen zur Präservation von kaninem Amnion für die
Anwendung bei Korneadefekten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Sophie Buchheim
aus Leipzig

Leipzig, 2019

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Gerhard U. Oechtering
Prof. Dr. Christoph K.W. Mülling

Gutachter: Prof. Dr. Gerhard U. Oechtering, Klinik für Kleintiere,
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig
Prof. Dr. Christoph K.W. Mülling, Veterinär-Anatomisches Institut,
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig
Prof. Dr. Roberto Köstlin, Tierklinik Germering, Germering

Tag der Verteidigung: 08.10.2019

Danksagung

Diese Dissertation entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Klinik für Kleintiere der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig. Ich möchte mich an dieser Stelle bei all jenen bedanken, die mich während dieser Zeit unterstützt haben. Besonders möchte ich meinen akademischen Betreuern Prof. Dr. Gerhard U. Oechtering und Prof. Dr. Christoph K.W. Mülling danken. Ihr fachlicher Rat und ihr persönlicher Beistand haben maßgeblich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen. Ferner möchte ich Prof. Dr. Roberto Köstlin für die Bereitschaft zur Erstellung des Zweitgutachtens herzlich danken. Frau Dr. A. Steinmetz, als Spezialistin auf dem Gebiet der Veterinärophthalmologie, unterstützte mich während der Erstellung dieser Dissertation jederzeit bei fachspezifischen Fragen, wofür ich ihr auf diesem Weg ebenfalls danken möchte. Ein weiterer Dank gilt dem Veterinär-Pathologischen Institut, welches die in dieser Arbeit untersuchten histologischen Schnitte anfertigte. Hier möchte ich besonders Herrn Dr. D. Böttcher sowie Frau Wipplinger für die Unterstützung bei Methodenfragen danken. Auch danke ich dem Institut für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät für die mikrobiologische Untersuchung der hier verwendeten Proben. Prof. Dr. Benjamin R. Auer danke ich zum einen aus fachlichen Gründen, da er mich während der Entstehung dieser Arbeit bei der Anwendung der statistischen Methoden unterstützte. Zum anderen danke ich ihm aus persönlichen Gründen, da er mir in der Rolle als mein Freund und Gefährte in dieser Zeit stets zur Seite stand. Außerdem möchte ich meinen Kollegen der Klinik für Kleintiere danken, da sie es durch ihre moralische Unterstützung und den Zusammenhalt im Team geschafft haben, mir den nun begangenen Weg zu erleichtern. Schließlich danke ich auf diesem Wege meinen Eltern, die immer an mich geglaubt, mir das Studium der Veterinärmedizin ermöglicht und damit den Weg zum Verfassen dieser Dissertation geebnet haben.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Die Kornea (Hornhaut).....	3
2.1.1 Histologischer Aufbau der Kornea	3
2.1.2 Physiologie der Kornea	6
2.1.3 Korneale Defekte	7
2.1.3.1 Ulzerationen	7
2.1.3.2 Andere ausgewählte korneale Erkrankungen.....	8
2.1.4 Therapie der ulzerativen Keratitis.....	9
2.1.4.1 Antibakterielle Therapie	10
2.1.4.2 Uveitisprophylaxe und Analgesie.....	12
2.1.4.3 Gewebstabilisierung	12
2.1.4.4 Erhalt der kornealen Funktionalität und Transparenz	12
2.1.4.5 Gewebsunterstützung	13
2.1.4.6 Chirurgische Therapie.....	14
2.1.5 Die Hornhauttransplantation (Keratoplastik).....	16
2.1.6 Wundheilung der Kornea.....	17
2.1.6.1 Epithelheilung.....	17
2.1.6.2 Stromale Wundheilung	18
2.1.6.3 Endothelheilung	19
2.2 Das Amnion	19
2.2.1 Anatomischer Aufbau beim Fleischfresser	20
2.2.2 Histologischer Aufbau.....	20
2.3 Eigenschaften der Amnionmembran.....	21
2.3.1 Antiinflammatorische sowie Narben reduzierende Eigenschaften	21
2.3.2 Reepithelisierung	22
2.3.3 Immunmodulatorische Effekte.....	23
2.3.4 Einfluss auf die Angiogenese.....	23
2.3.5 Antimikrobielle Eigenschaften.....	24
2.3.6 Analgetische Wirkung.....	25
2.3.7 Mechanische Eigenschaften.....	25
2.3.8 Permeabilität.....	25
2.4 Anwendung der Amnionmembran.....	26
2.4.1 Anwendung der Amnionmembran in der Humanmedizin	26
2.4.2 Anwendung der Amnionmembran in der Veterinärmedizin	26
2.4.3 Chirurgische Techniken zur Rekonstruktion der Korneaoberfläche.....	29
2.4.4 Konservierungsmethoden der AM zur kornealen Rekonstruktion.....	30

3	Material und Methoden	34
3.1	Gewinnung und Präparation der kaninen Amnionmembran	34
3.1.1	Gewinnung der Fruchthüllen	34
3.1.2	Ein-und Ausschlusskriterien.....	35
3.1.3	Isolierung der Amnionmembran	35
3.2	Kryokonservierung der kaninen Amnionmembran.....	36
3.2.1	Herstellung der Kryokonservierungslösung.....	36
3.2.2	Durchführung der Kryokonservierung und Lagerung der Proben	36
3.2.3	Definition der Untersuchungszeitpunkte	37
3.3	Histologische Probenaufarbeitung	38
3.3.1	Paraffineinbettung und Schnittpräparation.....	38
3.3.2	Histologische Auswertung	38
3.3.2.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)	38
3.3.2.2	Periodic Acid Schiff Reaktion (PAS-Reaktion)	38
3.3.2.3	Immunhistologische Färbung.....	43
3.4	Bakteriologische und mykologische Untersuchung.....	47
3.5	Statistische Auswertung.....	48
4	Ergebnisse	49
4.1	Histologische Ergebnisse	49
4.1.1	Dickenmessung der Amnionmembran.....	49
4.1.2	Beurteilung der Basalmembran des Amnions.....	52
4.1.3	Morphologische Beurteilung der Amnionmembran.....	61
4.1.4	Zusammenhang zwischen der Dicke und der Stromabeschaffenheit der Amnionmembran	70
4.2	Bakteriologische und mykologische Ergebnisse.....	71
5	Diskussion	73
5.1	Material und Methoden	74
5.2	Ergebnisse der Dickenmessung der AM	81
5.3	Ergebnisse der Basalmembranbeurteilung (Immunhistologische Untersuchung).....	82
5.4	Ergebnisse der morphologischen Untersuchung der AM	84
5.5	Ergebnisse der bakteriologischen und mykologischen Untersuchung	89
5.6	Fazit	93
6	Zusammenfassung	96
7	Summary	98
	Literaturverzeichnis	100
	Anhang	119
	Protokoll der immunhistologischen Färbung (Laminin).....	119

Abkürzungsverzeichnis

AA.....	Allantoamnion
AM.....	Amnionmembran
ATP.....	Adenosintri-phosphat
bFGF.....	basic Fibroblast growth factor
BM.....	Basalmembran
CGRP.....	Calcitonin gene-related peptide
DAB.....	3,3'-Diaminobenzidin
DM.....	Descemet'sche Membran
DMEM.....	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EAM.....	Equine Amnionmembran
EGF.....	Epidermal growth factor
EnMT.....	Endothelial mesenchymal transition
FGF-2.....	Fibroblast growth factor 2
HAEC.....	Humane Amnionepithelzellen
HC-HA.....	Hochmolekulare Hyaluronsäure
HGF.....	Hepatocyte growth factor
IL-10.....	Interleukin-10
IL-1RA.....	Interleukin-1 Rezeptor Antagonist
IL-1 β	Interleukin-1 beta
KAM.....	Kanine Amnionmembran
KGF.....	Keratinocyte growth factor
MHC.....	Major histocompatibility complex
NGF.....	Nerve growth factor
PAA.....	Peroxyessigsäure
PDGF.....	Platled-derived growth factor
PEDF.....	Pigment epithelium-derived factor
SP.....	Substanz P
TEM.....	Transmissionselektronenmikroskop
TGF.....	Transforming growth factor
TGF- α	Transforming growth factor alpha
TGF- β	Transforming growth factor beta
TNF.....	Tumor-Nekrose-Faktor
VEGF.....	Vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

Die Amniontransplantation ist in der Humanmedizin eine etablierte Methode für die chirurgische Versorgung verschiedener kornealer und konjunktivaler Erkrankungen. Sie kommt inzwischen auch in der Veterinärmedizin auf diesem Gebiet zum Einsatz. Dazu gehören beim Menschen vor allem korneale Ulzerationen, die limbale Stammzelldefizienz, die bullöse Keratopathie, das Pterygium, das Symblepharon, Verätzungen, sowie Neoplasien der Hornhaut oder Konjunktiva (LIU et al. 2010, MELLER et al. 2011). Beim Tier kommt vor allem die equine Amnionmembran (EAM) sowohl als allogenes als auch xenogenes Transplantat zum Einsatz. So wird sie mitunter bei einschmelzenden Ulzerationen, kornealer Malazie oder fungaler Keratitis am Pferdeauge eingesetzt (LASSALINE et al. 2005, PLUMMER et al. 2009). Weiterhin zählen auch großflächige korneo-limbale Defekte nach Tumorentfernung zu den Anwendungsgebieten der EAM (OLLIVIER et al. 2006). Beim Hund sind als hauptsächliche Indikationen ebenfalls korneale Ulzerationen zu nennen (OLLIVIER 2008, ARCELLI et al. 2009). Des Weiteren kam die Amnionmembran (AM) bei dieser Spezies ebenfalls nach der Entfernung korneo-limbaler Dermoiden und Inklusionszysten sowie für korneale Erosionen erfolgreich zum Einsatz (KALPRAVIDH et al. 2009, KIM et al. 2009, CHOI et al. 2010). Für die Rekonstruktion von kornealen Defekten beim Hund wird in den erwähnten Studien in aller Regel EAM verwendet. Lediglich KALPRAVIDH et al. (2009) verwenden kanine Amnionmembran (KAM) nach Dermoidentfernung am Hundeauge.

Die AM eignet sich aufgrund ihrer Eigenschaften als biologisches Transplantat am Auge und ist anderen Rekonstruktionsmöglichkeiten in einigen Punkten überlegen. Durch ihre niedrige Immunogenität (AKLE et al. 1981), kommt es selten zu einer Abstoßungsreaktion, die zum Beispiel bei korneo-kornealen Transplantationen eine gefürchtete Komplikation darstellt, wenn kein Immunsuppressivum verabreicht wird (LACERDA et al. 2017). Im Gegensatz zu konjunktivalen Verschieplastiken oder konjunktivalen Transplantationen, welche immer zu einer gewissen Transparenzminderung der Kornea führen (GELATT und GELATT 2011), kommt es durch die Verwendung von AM aufgrund ihrer avaskulären Struktur sowie ihrer antiinflammatorischen (BOURNE 1960, HAO et al. 2000, SHIMMURA et al. 2001, SOLOMON et al. 2001) und narbenreduzierenden Eigenschaften (TSENG et al. 1999, LEE et al. 2000) regelmäßig zu einer Verbesserung der Transparenz der Kornea und damit des Visus (LEE und TSENG 1997, KALPRAVIDH et al. 2009, BARACHETTI et al. 2010). Weitere Eigenschaften, welche die korneale Wundheilung positiv beeinflussen sind die Förderung der Reepithelisierung (YANG et al. 2006, LO und POPE 2009), eine gute Wundadhärenz (LO und POPE 2009) sowie antimikrobielle Faktoren (MAO et al. 2017).

Nachdem die humane Amnionmembran (HAM) bereits bis zur Mitte des 20sten Jahrhunderts zur Behandlung von Brandwunden und als Hauttransplantat Verwendung fand (DAVIS 1910, SABELLA 1913, DOUGLAS 1952) wurde ihre Verwendung danach aufgrund ihrer potentiellen Infektiösität eingedämmt. Erst mit der Etablierung neuer Konservierungsverfahren wie der Kryopräservation durch LEE und TSENG (1997) ergab sich wieder eine häufigere Nutzung der HAM. Durch diese Art der Lagerung wird die zweimalige serologische Testung des Spenders auf potentielle Infektionskrankheiten wie HIV, Hepatitis B und C, Syphilis sowie eine Zytomegalievirusinfektion, direkt nach der Geburt und sechs Monate später zur Detektion einer etwaigen Serokonversion, möglich (LO und POPE 2009). Mit der Zeit entwickelten sich noch viele andere Methoden zur Konservierung/Sterilisierung der HAM wie die Lyophilisierung, die Lufttrocknung, die Behandlung mit γ -Strahlen sowie die Verwendung von Peroxyessigsäure. Unter diesen ist die Kryopräservation das am häufigsten angewendete Verfahren zur Haltbarmachung der HAM, welche zu rekonstruktiven Zwecken am Auge eingesetzt wird. Unterschiedliche Studien haben gezeigt, dass durch sie sowohl die strukturellen als auch die biologischen Eigenschaften der HAM bei längeren Lagerungszeit bis zu 24 Monaten gut erhalten bleiben (THOMASEN et al. 2011, COOKE et al. 2014).

Beim Hund spielt die Verwendung autologer AM zur Zeit noch eine eher untergeordnete Rolle. Zudem existieren derzeit keine belastbaren Daten über die Qualität und Qualitätsänderungen im Laufe der Kryolagerung sowie über den Einsatz kryokonservierter KAM zur Behandlung kornealer Läsionen beim Hund. Ziel der hier vorgelegten Arbeit ist es deshalb die kanine Amnionmembran hinsichtlich ihres morphologischen und mikrobiellen Zustandes vor sowie unter/nach dem Einfluss der Kryopräservation zu untersuchen und damit den Weg für ihre klinische Anwendung am Hundeauge zu ebnen.

Dabei ergeben sich die folgenden drei zentralen Fragestellungen:

1. In welchem Zustand befindet sich die KAM unmittelbar nach der Entnahme?
2. Wie wirkt sich der Gefrierprozess auf die KAM aus?
3. Welchen Einfluss hat die Langzeitkonservierung in Glycerin bei - 80 °C auf die KAM?

2 Literaturübersicht

2.1 Die Kornea (Hornhaut)

Die äußere Augenhaut (Tunica fibrosa bulbi) besteht aus der Hornhaut und der Lederhaut (Sclera) (NICKEL et al. 2004, Kapitel Sehorgan). Zusammen übernehmen sie vor allem mechanische Eigenschaften und schützen das Auge vor äußeren Noxen. Dabei ist die Sklera, bestehend aus vorwiegend festen Kollagenfaserbündeln (NICKEL et al. 2004, Kapitel Sehorgan), die stabilisierende und formgebende Schicht des Auges. Des Weiteren erlaubt die Transparenz der Kornea den Einfall von Licht in das Augeninnere. Neben der Linse und dem Glaskörper ist sie für den größten Teil der Lichtbrechung verantwortlich (MEEK und FULLWOOD 2001). Der Hund hat eine annähernd runde Hornhaut, deren horizontaler Durchmesser 13 bis 17 mm beträgt (WALDE 2008). Die durchschnittliche Dicke der Hornhaut beträgt beim Hund $562 \pm 6,2 \mu\text{m}$, wobei diese in der Peripherie um durchschnittliche $49,43 \pm 8,45 \mu\text{m}$ dicker ist als im Zentrum (GILGER et al. 1991). Bei Katzen beträgt die durchschnittliche zentrale Korneadicke $578 \pm 64 \mu\text{m}$ (GILGER et al. 1993). Hier besteht kein signifikanter Unterschied zwischen zentraler und peripherer Dicke der Hornhaut. Der Übergang des durchsichtigen Hornhautepithels in die Lederhaut stellt den Limbus dar (VAN BUSKIRK 1989). Die Kornea bildet über ihre Vorwölbung aus dem Augapfel den vorderen Augenpol. Das Zentrum des vorderen Augenpols ist der Vertex corneae (TÓTH et al. 2010). Die Hornhaut besteht aus 3 Zonen, die nahezu grenzenlos ineinander übergehen. In der Mitte der Kornea befindet sich die zentrale Zone. Darauf folgt die periphere Zone, welche bis zur inneren Limbusgrenze reicht. In der dritten Zone, der limbalen Zone, gehen Kornea und Sklera ineinander über (CLARK 1974).

2.1.1 Histologischer Aufbau der Kornea

Die Hornhaut ist, wie in Abbildung 1 dargestellt, histologisch in fünf Schichten unterteilt. Die äußerste Schicht bildet das vordere Hornhautepithel (Epithelium anterius corneae). Auf dieses folgt die vordere Grenzmembran (Lamina limitans anterior oder Bowmansche Membran). In der Mitte der Hornhaut befindet sich die Eigenschicht der Hornhaut (Substantia propria oder Stroma). Die hintere Grenzmembran (Lamina limitans posterior oder Descemetsche Membran), welche sich dem Stroma anschließt, trennt dieses vom hinteren Hornhautepithel (Epithelium posterius corneae oder Endothel) (SMOLLICH und MICHEL 1992, LIEBICH und BUDRAS 2010).

Das Hornhautepithel ist ein unverhorntes Plattenepithel (KENYON 1979), welches beim Fleischfresser eine Dicke von circa 25-40 μm aufweist und beim Hund laut SMOLLICH

und MICHEL (1992, Kapitel: Sinnesorgane) aus 5-8 Zellagen besteht. Die Dicke des Epithels nimmt von der Peripherie zum Zentrum der Hornhaut ab (GELATT et al. 2013, Kapitel: Ophthalmic anatomy). Das Epithel ist in sich nochmals in drei Schichten unterteilt. Die basale Schicht (Stratum basale) besteht aus einer Reihe säulenartig angeordneter Zellen (SHIVELY und EPLING 1970), welche anteilig die Bausteine der Basalmembran bilden (KENYON 1979). Die Zellen des Stratum basale sind über Hemidesmosomen mit der Basalmembran verbunden (BUCK 1983). Die Basalmembran selbst besteht aus Kollagen Typ IV, Laminin, Fibronectin und Heparansulfan und ist so die Basis für die Epithelzellmigration (LEVIN et al. 2011, Kapitel: cornea and sclera). Dem Stratum basale ist die mittlere Schicht (Stratum intermedium) aufgelagert. Diese besteht beim Fleischfresser aus zwei bis drei Schichten polygonal geformter Zellen (GELATT et al. 2013, Kapitel: Ophthalmic anatomy). Darauf folgt die oberste Schicht (Stratum superficiale) aus longitudinalen und flachen Zellen. Über die Ausformung von tight junctions zwischen den Zellen, entsteht ein dichter Zellverband mit einer geringen Permeabilität (KENYON 1979). Die Superfizialzellen werden in regelmäßigen Abständen per Desquamation in den Tränenfilm abgegeben und durch nachgeschobene Zellen ersetzt (HANNA et al. 1961, SMOLLICH und MICHEL 1992, Kapitel: Sinnesorgane). Nach der Abschilferung der oberflächlichen Epithelzellen entstehen zunächst kleine Defekte in der Oberfläche der Hornhaut (HABERICH und LINGELBACH 1982). Diese werden durch die Einwanderung neuer Epithelzellen aus dem korneoskleralen Limbus wieder verschlossen. Der Limbus stellt auch eine Trennung zwischen konjunktivalen und kornealen Zellen her und verhindert so die Migration von konjunktivalen Zellen auf die Hornhautoberfläche (DUA und AZUARA-BLANCO 2000). Auf der Oberfläche der Hornhaut befindet sich außerdem kleinere fingerförmige Ausstülpungen (Microvilli) sowie kurze Falten (Mikroplicae) und lange Falten (Microridges). Diese dienen durch die Vergrößerung der Zelloberfläche dem Transport von Nährstoffen in die Zelle sowie dem Abtransport von Stoffwechselprodukten aus ihr heraus (COLLIN und COLLIN 2000).

Die vordere Grenzmembran (Bowmansche Membran) bildet die erste und damit äußerste Schicht des Stromas. Sie ist beim Hund allerdings nicht anzutreffen (ODA und FUKUDA SHOICHI 1962). Die Eigenschicht (das Stroma) nimmt ungefähr 90 % der gesamten Hornhaut ein und besteht aus kollagenhaltigem Bindegewebe (POOLE et al. 1993). In der extrazellulären Matrix sind vereinzelt Keratozyten zu finden (MAURICE 1957), bei denen es sich um differenzierte Fibroblasten handelt. Ihre Aufgabe ist der Aufbau und Aufrechterhaltung der extrazellulären Matrix und damit die Erhaltung der stromalen Integrität sowie der hochorganisierten Struktur, welche maßgeblich zur kornealen Transparenz beiträgt (POOLE et al. 1993). Ihre Dichte nimmt von anterior nach posterior ab (HAHNEL et al. 2000, KAFARNIK et al. 2007), wobei die Keratozyten nahe der Hornhautoberfläche im Vergleich zum hinteren Bereich des Stromas in ungeordneter Form vorliegen (MÜLLER et al. 1995). Die Keratozyten des Stromas stehen über Zellfortsätze miteinander in Verbindung, sodass ein funktionelles Geflecht entsteht (KANG und KO 2005). Weitere zelluläre

Bestandteile des Stromas sind sogenannte Wanderzellen, die in der Regel als Leukozyten anzusprechen sind (GELATT et al. 2013, Kapitel: Ophthalmic anatomy).

Die extrazelluläre Matrix besteht aus dichten, parallelangeordneten Kollagenfibrillen, welche sich in einem Grundgerüst aus Glykoproteinen und Proteoglykanen befinden (MAURICE 1957). Die Kollagene des Typs I, III, V, VI und XII sind hierbei die Hauptbestandteile des Stromas (GELATT et al. 2013, Kapitel: Ophthalmic anatomy). Das Grundgerüst besteht außerdem aus Keratansulfat, Dermatan-sulfat und Chondroitin-4-sulfat und ist in der Lage Wasser zu binden (CASTORO et al. 1988), sodass der Wassergehalt des Stromas 78 % beträgt (BETTELHEIM und PLESSY 1975). Die in Bündeln angeordneten Kollagenfibrillen bilden durch zahlreiche Verbindungen miteinander sogenannte Lamellen und damit ein dreidimensionales Fasernetzwerk (RADNER et al. 1998). Die Anordnung der Lamellen ist im hinteren Anteil gleichmäßiger als im vorderen Drittel des Stromas (MÜLLER et al. 2001). Die Transparenz der Kornea basiert auf der besonderen Ausrichtung der Kollagenfibrillen sowie der Beschaffenheit des Stromas (LEVIN et al. 2011, Kapitel: Cornea and sclera).

Die hintere Grenzmembran (Descemet'sche Membran) markiert die Trennung zwischen Stroma und dem Korneaendothel. Sie fungiert als Basalmembran und wird von den Endothelzellen der Kornea produziert (LABERMEIER und KENNEY 1983). Die Anfärbung ist, wie bei allen Basalmembranen, mit Hilfe der PAS-Reaktion möglich (DAY 1950). Die Descemet'sche Membran (DM) lässt sich elektronenmikroskopisch nochmals in drei Schichten unterteilen. Dazu gehört eine dem Stroma zugewandte dünne ungestreifte Schicht, an die sich eine breite gestreifte Schicht anschließt. Dem Endothel zugewandt befindet sich nochmals eine breitgestreifte Schicht (GELATT et al. 2013, Kapitel: Ophthalmic anatomy). Durch eine sehr regelmäßige Struktur nimmt JAKUS (1956) eine höhere Widerstandsfähigkeit im Vergleich zum Stroma an. GELATT et al. (2013, Kapitel: Ophthalmic anatomy) bezeichnen sie deshalb als eine Schutzschicht im Bereich der Kornea.

Das hintere Hornhautepithel (Endothel) ist ein einschichtiges Plattenepithel (DRENCKHAHN et al. 2004, Kapitel: Äußere Augenhaut (Tunica fibrosa bulbi)) aus einer Lage isoprismatischer Zellen (RODRIGUES et al. 2006), welche ein hohes Maß an metabolischer Aktivität aufweisen (GELATT et al. 2013, Kapitel: Ophthalmic anatomy). Elektronenmikroskopisch lässt sich eine mosaikähnliche Anordnung der Zellen erkennen (SHERRARD und NG 1990). Die Endothelzellen tragen apikal zarte mikrovilliähnliche Fortsätze, die in die vordere Augenkammer hinein reichen (DOUGHTY 1998). Des Weiteren besitzt jede Endothelzelle eine sogenannte Primärzilie (GALLAGHER 1980). Die Endothelzellen besitzen nur eine geringe Teilungsfähigkeit, weshalb die Erhaltung der Integrität des Endothels vor allem durch Zellvergrößerung und Zellmigration gewährleistet wird (GWIN et al. 1982, MACCALLUM et al. 1983).

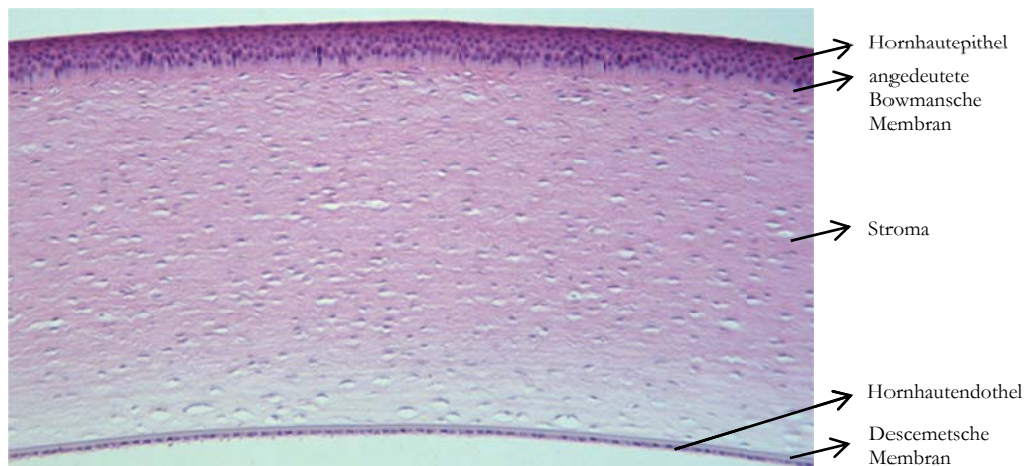


Abbildung 1: Lichtmikroskopisches Bild einer physiologischen kaninen Kornea, H.E.-Färbung, 200fache Vergrößerung

Quelle: https://www2.vetmed.ucdavis.edu/courses/vet_eyes/eye_path/epath_overview_index.htm

2.1.2 Physiologie der Kornea

Die Hornhaut sorgt unter allen Brechmedien des Auges für die stärkste Brechkraft (HOLLY und LEMP 1977). Die Hornhaut macht 70 % der Brechkraft des Auges aus und erlaubt den Eintritt von mehr als 90 % des auftreffenden Lichtes (HATAMI-MARBINI und ETEBU 2013). Das Licht wird durch die konvexe Krümmung der Hornhaut gebündelt und auf der Netzhaut zu einem Bild projiziert (GELATT et al. 2013, ARNOLD 2015). Je stärker die Krümmung der Kornea, desto stärker ist ihre Brechkraft. So haben kleine Augen wie beispielsweise die von Katzen eine deutlich höhere Brechkraft als große Augen mit einer flacheren Hornhaut wie zum Beispiel die des Pferdes (GELATT et al. 2013).

Die Versorgung der avaskulären Hornhaut mit Sauerstoff, Glukose und essentiellen Nährstoffen erfolgt durch die wässrige Schicht des Tränenfilms (ROLANDO und ZIERHUT 2001) sowie durch das Kammerwasser und den Kapillaren im Limbusbereich. Die zugeführte Glukose wird hauptsächlich für die Herstellung von Adenosintriphosphat (ATP) benötigt. Das ATP wird dann für die Erhaltung des relativen Dehydratationsstatus der Kornea genutzt. Glukose wird im Hornhautepithel in Form von Glykogen gespeichert und kann im Bedarfsfall wieder in Glukose umgewandelt und freigegeben werden, wobei das korneale Endothel einen fünfmal höheren Glukoseverbrauch hat als das Epithel (GELATT et al. 2013). Der Tränenfilm enthält ebenfalls diverse Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel den epidermal growth factor (EGF) und den transforming growth factor beta (TGF- β), welche für die Epithelzellproliferation,- Migration- und Differenzierung wichtig sind, weshalb ein unversehrter Tränenfilm für die Intaktheit des Korneaepithels unerlässlich ist (TRIPATHI et al. 1990, KLENKLER et al. 2007).

Die Transparenz der Kornea ist abhängig vom Wasseranteil des Stromas, welcher einer engen Regulation unterliegt (VERKMAN 2003). Ohne einen aktiven Abtransport von Wasser hat das Stroma der Hornhaut die Eigenschaft Wasser aufzunehmen und in der

Folge aufzuquellen (HART 1947). Die Hornhaut wird aber durch die Aktivität von Ionenkanälen in einem relativen Dehydratationsstatus gehalten (WALDE 2008). Diese Ionenkanäle findet man im Epithel und Endothel der Kornea. Sie stellen einen osmotischen Druck her, dem die Wassermoleküle aus dem Stroma heraus folgen (TUFT und COSTER 1990). Der Wasseranteil der Hornhaut wird so bei circa 80 % aufrechterhalten (WALDE 2008). Des Weiteren enthalten die Zellen der Hornhaut Aquaporine (Wasserkanäle in der Zellmembran) über die ein transzellulärer Wasseraustausch möglich ist. Der endotheliale Wasserstrom verläuft jedoch hauptsächlich parazellulär ab (DIECKE et al. 2011, FISCHBARG 2012).

Die Kornea benötigt aufgrund ihres unmittelbaren Kontaktes zur Umgebung und damit verbundenen schädlichen Einflüssen eine Schutzschicht. Hierfür ist unter anderem das Hornhautepithel zuständig. Durch seine tight junctions im Stratum superficiale ist es nicht permeabel und erfüllt so seine Barrierefunktion (KLYCE und CROSSON 1985, WANG et al. 1993). Ein weiterer Mechanismus gegenüber äußeren Noxen ist der Tränenfilm in Kombination mit dem Lidschlag. So werden zum Beispiel Antigene, Fremdmaterial und abgestorbene Epithelzellen von der Hornhautoberfläche entfernt (ARGÜESO und GIPSON 2001, ROLANDO und ZIERHUT 2001, KNOP und KNOP 2007). Die äußere Lipidschicht des Tränenfilms hat weiterhin eine abweisende Wirkung gegenüber hydrophilen Teilchen (BRAUNINGER et al. 1972). Im Gegensatz zur Konjunktiva zeigt die Kornea eine eher gering ausgeprägte Immunantwort um die Entstehung einer Entzündung und damit verbundenen Beeinträchtigung der kornealen Transparenz zu vermeiden (ROLANDO und ZIERHUT 2001). Während sich unter physiologischen Umständen keine lymphatischen Zellen in der Hornhaut befinden (CURSIEFEN et al. 2002), konnten im Tränenfilm aber Proteine wie Albumin, Lysozym und Laktoferrin nachgewiesen werden, die eine antibakterielle Wirkung haben (EULE 2007). Ebenfalls im Tränenfilm enthalten sind Immunglobuline, vor allem Immunglobulin A, welches in Plasmazellen der Nickhautdrüse und der Konjunktiva gebildet wird (SCHLEGEL et al. 2003, EULE 2007).

2.1.3 Korneale Defekte

2.1.3.1 Ulzerationen

Ulzerationen gehören zu den häufigsten kornealen Defekten des Auges und werden je nach Tiefe in fünf verschiedene Kategorien eingeteilt. So können oberflächliche, mitteltiefe, tiefe, bis auf die Descemetsche Membran reichende sowie Perforationen der Kornea unterschieden werden.

Die Abbildung 2 zeigt ein mitteltiefes Ulcus bis hin zur Perforation. Oberflächliche Defekte betreffen lediglich die obersten Zellschichten des Hornhautepithels. Bei mitteltiefen Defekten ist maximal ein Drittel der Hornhautdicke durch die Läsion betroffen. Substanzverluste, die darunter liegende Schichten betreffen, zählen zu den tiefen Defekten. Läsionen, die bis zur DM reichen, zeichnen sich zentral durch ein kleines klares Fenster

und eine Vorwölbung der DM in den Defekt aus. Dieses Phänomen bezeichnet man als Descemetocèle. Im Falle einer Perforation ist die Kornea durch all ihre Schichten geschädigt und es kommt zum Austritt von Kammerwasser. Bei größeren Perforationen kommt es häufig zu einem Vorfall von Irisgewebe (STADES 2006).

Die Ursachen für Ulzerationen der Kornea, auch ulzerative Keratitis genannt, sind mannigfaltig und reichen von traumatischen Insulten über Fremdkörper, der Einwirkung von chemische Noxen, Tränenfilmproduktionsstörungen, Zilienanomalien bis hin zu immundiagnostierten Erkrankungen sowie systemischen Infektionskrankheiten wie der Herpes-Virus-Infektion bei Katzen. Die klinischen Symptome können ein vermehrter Tränenfluss oder muzinöse/eitrige Epiphora, Blepharospasmus und/oder Photophobie sein. Die klinische Ausprägung ist Ausdruck eines okulären Schmerzes, welcher sich in unterschiedlichen Stärken, von mild bis schwergradig, präsentieren kann (PETERSEN-JONES 2002, Kapitel: The cornea).



Abbildung 2: Mitteltiefes Ulcus (links oben), tiefes Ulcus (rechts oben), Descemetocèle (unten links), rupturierte Descemetocèle (unten rechts) jeweils bei einem Hund. Quelle: A. Steinmetz, Klinik für Kleintiere, Universität Leipzig

2.1.3.2 Andere ausgewählte korneale Erkrankungen

Laut PETERSEN-JONES (2002) kann es beim Hund in sehr seltenen Fällen zur Ausbildung kornealer Neoplasien kommen. Diese können primär oder sekundär sein. Die häufigsten primären Tumoren der Hornhaut sind das intraepitheliale Plattenepithelkarzinom und das Papillom. Des Weiteren existieren einzelne Fallberichte über korneale Epitheliome

und korneale Adenokarzinome. Die häufigste sekundäre Neoplasie der Kornea ist das Lymphom.

Zu den gutartigen die Hornhaut betreffenden Prozessen zählt unter anderem die epitheliale Einschlusszyste, welche sich als gut abgegrenzte, weiße, im Stroma befindliche Struktur darstellt. Um Sie herum finden sich keine Entzündungsanzeichen. Als Ursache für deren Entstehung kommt am ehesten ein voran gegangenes Trauma in Betracht, bei dem es zu einem Eintrag von Epithelzellen ins Stroma gekommen ist. Hierfür sprechen das häufig unilaterale Auftreten mit der Vorgeschichte eines Traumas sowie das Entstehungsalter von 4-12 Jahren. Eine kongenitale Entstehung gilt deshalb als unwahrscheinlich (BEDFORD et al. 1990). Der Pathomechanismus ist allerdings nicht vollständig geklärt. Eine weitere korneale Pathologie ist das Dermoid. Hierbei handelt es sich um ein gutartiges Gewebe an einer unphysiologischen Lokalisation. Dermoiden bestehen aus einem verhornten Plattenepithel, Haaren, Blutgefäßen, Bindegewebe, Fett, Nervenfasern, Drüsengewebe und glatten Muskelfaserzügen. Sie entstehen in der Regel am temporalen Limbus und erstrecken sich dann über Sklera und Kornea nach medial (PFEIFFER 1983). Als Ansammlung von zugrunde gegangenen Entzündungszellen stellt der korneale Abszess eine entzündliche Läsion dar, die sich im oberflächlichen oder tiefen Stroma befindet. Der Abszess kann steriler oder infektiöser Natur sein (GELATT 1999).

2.1.4 Therapie der ulzerativen Keratitis

Laut GELATT (1999) ist die Identifikation der Ursache sowie deren Beseitigung für eine erfolgreiche Therapie unumgänglich. Außerdem spielt nach Aussage des Autors die Bestimmung des Schweregrades der Ulzeration für die Behandlungsform eine wichtige Rolle. Um beides zu erreichen, sollte eine komplette ophthalmologische Untersuchung durchgeführt werden. Hierbei ist laut Aussage des Autors insbesondere auf die Lidfunktion und deren Konfiguration, mögliche Zilienanomalien sowie Störungen der Tränenfilmproduktion zu achten. Auch Fremdkörper oder wiederholte Traumata stellen mögliche Ursachen dar.

Nach KERN (1990) besteht die medikamentelle Therapie bei Hund und Katze aus 6 Säulen. Diese sind der Einsatz von Antibiotika, die Prophylaxe und Kontrolle einer Uveitis anterior, die Schmerztherapie, das Verhindern eines weiteren Gewebsunterganges, die Erhaltung der kornealen Transparenz und Funktionalität sowie eine Gewebsunterstützung.

Die chirurgische Therapie bei Hund und Katze besteht aus dem Verhindern einer Perforation, der Reparatur einer möglichen Perforation, dem Schutz der Hornhaut während der Heilung sowie einer Verzögerung bzw. Verhinderung einer Einschmelzung des kornealen Stromas (KERN 1990). Nach GELATT (1999) ist eine chirurgische Intervention bei kornealen Ulzerationen, die auf eine medikamentelle Therapie nicht ansprechen oder trotz dieser eine Verschlechterung zeigen indiziert. Des Weiteren sollten Defekte, die mehr als die Hälfte der Hornhautdicke einnehmen chirurgisch versorgt werden. Dies gilt auch für

einschmelzende, mikrobiell besiedelte oder indolente Ulzera. Da eine operative Versorgung wie oben beschrieben bei komplizierten Verläufen mit antibiotischer Vorbehandlung durchgeführt wird, sollte hier eine bakteriologische und mykologische Untersuchung des Ulcus inklusive eines Antibiogramms eingeleitet werden, welches die postoperative antimikrobielle Therapie bestimmt (WILKIE und WHITTAKER 1997, PAPICH 2013). Die Art des chirurgischen Eingriffs richtet sich nach den Charakteristika des Ulcus (WILKIE und WHITTAKER 1997).

2.1.4.1 Antibakterielle Therapie

Laut KERN (1990) ist eine prophylaktische topische antibiotische Behandlung oberflächlicher Ulzerationen alle sechs bis acht Stunden ausreichend. Bei stromalen Defekten, die weniger als ein Drittel der Korneadicke betreffen, empfiehlt der Autor eine Intensivierung der topischen Behandlung auf alle vier bis sechs Stunden. Tiefe, sich schnell entwickelnde Defekte, bedürfen einer stündlichen topischen antibiotischen Therapie, die nicht selten durch eine subkonjunktivale Therapie unterstützt wird. Eine subkonjunktivale antibiotische Therapie in Form einer Injektion wird also bei bakteriell besiedelten Ulcera sowie Defekten mit der Tendenz zur rapiden Progression eingesetzt. Die systemische Antibiotikagabe ist nach der Aussage des Autors eher selten indiziert, da die erreichten Antibiotikakonzentrationen in der Kornea deutlich unter denen der topischen und subkonjunktivalen Gabe liegen.

Die Wahl des Antibiotikums bei der topischen Therapie ist ebenfalls abhängig von der Art sowie dem Stadium des Ulcus. Des Weiteren spielt die zu erwartende Bakterienflora eine wichtige Rolle. So konnten in einer retrospektiven Studie kaniner bakteriell bedingter Konjunktividen und infektiöser Keratitiden vor allem Staphylokokken und Streptokokken-spezies nachgewiesen werden (TWEDT und BONAGURA 2014), während gramnegative Bakterien eher selten beteiligt waren. Trotzdem sollte, vor allem bei einer raschen Verschlechterung des Ulcus, an eine Beteiligung durch *Pseudomonas aeruginosa* gedacht werden, da auch dieses Bakterium beim Hund regelmäßig nachgewiesen wird (TOLAR et al. 2006). Bei der Katze zeigt sich ein ähnliches bakterielles Spektrum, welches um die Erreger *Chlamydophila psittaci (felis)* und *Mykoplasma felis* ergänzt wird (TWEDT und BONAGURA 2014).

Für die prophylaktische Anwendung bei kornealen Ulzerationen sowie bakteriellen Konjunktividen haben sich in der Tiermedizin die drei Antibiotika Neomycin, Bacitracin und Polymyxin B in Kombination als gut wirksam erwiesen (DOWLING und GRAHN 1998). Durch ihr breites Wirkspektrum sind sie zur Prophylaxe besonders geeignet. So zeichnet sich Neomycin nach Aussage der Autoren durch eine gute bakterizide Aktivität gegenüber Staphylokokken und gramnegativen Bakterien aus. Die Resistenzlage gegenüber Pseudomonaden ist allerdings schlecht. Dafür zeigt Polymyxin B eine ausgezeichnete Wirkung gegenüber gramnegativen Bakterien, insbesondere gegen Pseudomonaden. So konnten HARIHARAN et al. (1995) in ihrer Studie zeigen, dass 100 % der pathogenen Isolate von

Pseudomonas aeruginosa sensibel gegenüber Polymyxin B waren. Bacitracin zeichnet sich über seinen β -lactam Wirkmechanismus durch eine gute Wirksamkeit gegen grampositive Bakterien aus. Gentamicin ist ein bakterizid wirkendes Aminoglycosid, welches laut DOWLING und GRAHN (1998) gegen viele gramnegative Bakterien eine gute Wirkung zeigt und sich auch gegenüber einigen gram-positive Bakterien wie zum Beispiel Staphylokokken in der Regel sensibel zeigt. Streptokokken hingegen können eher resistent sein. Pseudomonaden, die laut den Autoren zu Beginn der Therapie sensibel gegenüber Gentamycin sind, können im Laufe der Behandlung Resistenzen entwickeln, weshalb engmaschige Kontrollen erfolgen sollten. Bei fehlendem Therapieerfolg, empfehlen die Autoren die Durchführung einer bakteriologischen Untersuchung sowie die Anfertigung eines Resistenztestes. Die Autoren nennen Chloramphenicol als ein weiteres Breitbandantibiotikum, welches beim Kleintier als erstes Therapeutikum angewandt werden kann. So zeigt Chloramphenicol eine sehr gute bakteriostatische Wirkung gegenüber Chlamydien und Mykoplasmen. Im gram-negativen Bereich besitzt es eine schwächere Wirksamkeit als die Aminoglykoside und die Fluorchinolone. Des Weiteren kann laut den Autoren eine nur sehr schlechte Wirksamkeit gegenüber Pseudomonaden festgestellt werden. Allerdings ist der Wirkstoff in Lage das intakte Korneaepithel zu überwinden, sodass es für die Therapie von stromalen Abszessen gut geeignet ist.

Die subkonjunktivale Injektion und topische antibiotische Therapie sind als gleichermaßen wirksam anzusehen (BAUM und BARZA 1983). Laut den Autoren kommt es bei der subkonjunktivalen Therapie kurzzeitig zu hohen Wirkspiegeln, während es beim topischen Antibiotikaeinsatz in Form von Augentropfen zu einem moderaten und über die Zeit gleichmäßigen Wirkspielanstieg kommt. Letzteres ist für eine erfolgreiche antibakterielle Therapie nach Meinung der Autoren wünschenswerter als kurzzeitig sehr hohe Wirkspiegel. Die Nebenwirkungen einer subkonjunktivalen Injektionen können Granulombildung, konjunktivale Reizungen und intraokuläre oder intrasklerale Blutungen sein (DOWLING und GRAHN 1998). Häufig eingesetzte Wirkstoffe sind Penicilline, Cephalosporine und Gentamycin. Laut KERN (1990) ist die subkonjunktivale Antibiotikainjektion bei nachweislich bakteriell besiedelten Ulcera indiziert, die unter der topischen Therapie eine Verschlechterung zeigen sowie bei schlechter Besitzercompliance.

Ein systemischer Antibiotikaeinsatz ist bei Ulzerationen in tiefere Schichten sowie Perforationen der Hornhaut und Infektionen des inneren Auges indiziert. Hier kommt es zu einer Unterbrechung der Blut-Augen-Schranke, sodass Medikamente das Auge erreichen können. Die Antibiotikagabe sollte möglichst intravenös erfolgen, da es so schneller zu hohen Plasmaspiegeln und damit zu einer schnelleren Anflutung im Auge kommt. Die Wahl des Antibiotikums sollte möglichst erst nach zytologischer Beurteilung der Keimflora, also ob es sich um gram positive oder gram negative Bakterien handelt, erfolgen und zu einem späteren Zeitpunkt je nach Resistenzlage angepasst werden (DOWLING und GRAHN 1998).

2.1.4.2 Uveitisprophylaxe und Analgesie

Eine Uveitis lässt sich klinisch anhand einer Miosis bedingt durch einen Ziliarspasmus, einer konjunktivalen Hyperämie, einem verminderten intraokulären Druck sowie einem häufig auftretenden kornealen Ödem diagnostizieren (GELATT 1999). Die Therapie besteht laut dem Autor aus der sofortigen Anwendung eines lokal antiinflammatorischen Präparates. Sollte die Uveitis sekundär zu einer kornealen Ulzeration sein, verbietet sich die Gabe eines Kortikosteroids (GELATT 1999). In diesem Fall sollte ein nicht-steroidales Antiphlogistikum zum Einsatz kommen. Ein weiterer Pfeiler der Uveitistherapie ist die Herstellung einer Mydriasis mit Hilfe eines Parasympatholytikums wie dem Atropin. Die Weitstellung der Pupille dient zum einen der Prävention von Synechien zwischen Iris und Linse, zum anderen führt sie zu einer Erschlaffung von Iris und Ziliarkörper. Ersteres dient der Prophylaxe eines Sekundärglaukoms während Letzteres zu einer Analgesie der erwähnten Strukturen führt (GELATT 1999).

2.1.4.3 Gewebstabilisierung

Das Fortschreiten der Erkrankung im Sinne einer Einschmelzung des Stromas durch bakterielle Proteasen kann durch die Gabe verschiedener Substanzen verlangsamt oder verhindert werden. Hier ist beispielsweise die topische Therapie mit Vitamin B2 in Kombination mit UVA Licht, das sogenannte cross-linking, zu nennen. Hier kommt es zu einer stabilen Vernetzung zwischen kornealen Kollagenfasern, die durch eine kovalente Bindung miteinander verbunden sind (POT et al. 2014). Laut den Autoren dieser Studie hat diese Therapie einen stabilisierenden Effekt auf einschmelzende korneale Ulzerationen.

Eine weitere Therapie stellt die unterstützende Gabe von Serumaugentropfen dar. Laut TSUBOTA und HIGUCHI (2000) enthält Serum eine sehr ähnliche Konzentration essentieller Komponenten der natürlichen Tränenflüssigkeit wie zum Beispiel die Wachstumsfaktoren epidermal growth factor (EGF) und transforming growth factor (TGF) sowie Vitamin A und Metalloproteaseinhibitoren, welche in anderen Tränenersatzstoffen nicht enthalten sind. Die Faktoren, welche sich im Serum befinden führen nach YOUNG et al. (2004) zu einer verbesserten kornealen Epithelzellproliferation- und Differenzierung. Des Weiteren konnten WANG et al. (2017) zeigen, dass die Anwendung von autologem Serum in Kombination mit einer Silikon-Hydrogelkontaktlinse beim Mensch das Potenzial hat eine weitere Einschmelzung der Hornhaut im Akutstadium einer Ulzeration zu verhindern. Eine weitere Option stellt die topische Anwendung einer einprozentigen EDTA-Lösung in isotoner Kochsalzlösung dar. EDTA kann durch seine Kollagenase hemmenden Eigenschaften zur Stabilisierung des Ulcus eingesetzt werden (WALDE 2008).

2.1.4.4 Erhalt der kornealen Funktionalität und Transparenz

Der topische Einsatz von Kortikosteroiden wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Eigenschaften, die für deren Anwendung bei kornealen Ulzerationen sprechen, sind die Eindämmung der Entzündungsreaktion und die damit verbundene Reduktion der Narben-

bildung, Gefäßneubildung sowie Einschmelzung des kornealen Stromas (FOSCHI et al. 1994, HINDMAN et al. 2009). Die möglichen Komplikationen der Behandlung bestehen in einer verzögerten Epithelisierung sowie einer Verschlechterung beziehungsweise Rezidivierung bestehender oder bereits überwundener Infektionen des Ulcus (GRITZ et al. 1992, CHUNG et al. 1998). Topische Kortikosteroide sollten nach PETERSEN-JONES (2002) zur Prävention von Narbengewebe also erst nach abgeschlossener Epithelisierung eingesetzt werden. Die Gabe verbietet sich allerdings laut den Autoren bei bestehender mykotischer oder viraler Keratitis.

2.1.4.5 Gewebsunterstützung

Tränenersatzstoffe sollten unterstützend bei Tränenfilmproduktionsstörungen sowie vor allem bei brachycephalen Rassen vorkommenden Lagophthalmus zum Einsatz kommen (PETERSEN-JONES 2002). Man unterscheidet wässrige, muzinöse und fettige Tränenersatzlösungen. Bei Tränenproduktionsstörungen wie beispielweise der Keratoconjunktivitis sicca empfiehlt sich die Gabe von muzinösen Substanzen wie zum Beispiel der Hyaluronsäure, da diese einen länger schützenden Film aufrecht erhalten als die wässrigen Substanzen. Lipid haltige Produkte zeigen ebenfalls eine gute Haftung an der Kornea und müssen deshalb seltener eingegeben werden. Allerdings schränken Sie durch den entstehenden Film auf der Kornea die Sicht deutlich ein.

Eine weitere Option zur Unterstützung der Heilung von Hornhautulzerationen stellt sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin die Anwendung von Verbandslinsen dar. Durch das Tragen einer Verbandslinse konnte beim Mensch eine Reduktion des Schmerzes, eine Stabilisierung der Wunde sowie eine schnelleren Epithelisierung nachgewiesen werden (SAINI et al. 2013). So können die zumeist aus Silikonhydrogel bestehenden weichen Kontaktlinsen die Heilungsdauer von Hornhautulzerationen beim Menschen mit neurogener Keratitis laut SUN et al. (2014) deutlich verkürzen. Auch in der Veterinärmedizin existieren Hinweise, dass die Verwendung von Verbandslinsen einen positiven Einfluss auf die korneale Heilung hat. GOSLING et al. (2013) berichteten bei Hunden mit spontan aufgetretenen chronischen Ulzerationen der Kornea über eine erfolgreiche Heilung bei über 90 % der Patienten. Allerdings ist einschränkend zu sagen, dass die Therapie neben der Verwendung der Verbandslinse ein Debridement mittels einer Diamantfräse beinhaltete und es außerdem keine Vergleichsgruppe ohne Verbandslinse gab. Kritisch ist nach SAINI et al. (2013) auch zu bemerken, dass durch ein längeres Tragen der Kontaktlinsen Nebenwirkungen wie ein korneales Ödem, stromale Infiltrationen, Gefäßsprossungen sowie eine bakterielle Keratitis auftreten können. Beim Mensch beträgt die Inzidenz für das Auftreten einer bakteriellen Keratitis beim Tragen von weichen Tageskontaktlinsen 2,1- 4,1/10.000 pro Jahr, während sie sich bei längerem Tragen auf 13,3-20,9/10.000 pro Jahr erhöht. Sie steigt nochmals deutlich an, wenn die Linsen einen therapeutischen Zweck erfüllen. Hier liegt die Inzidenz bei 52/10000 pro Jahr (LIESEGANG

1997). Patienten, welche also mit einer Verbandslinse versorgt werden, sollten engmaschig kontrolliert werden. Beim Tier existieren hierzu derzeit noch keine belastbaren Daten.

2.1.4.6 Chirurgische Therapie

Die Art der chirurgischen Versorgung hängt vor allem von der Größe und der Tiefe des kornealen Defekts ab (WILKIE und WHITTAKER 1997). Die Therapie der Wahl bei einem indolenten Ulcus, welches durch sein oberflächliches Auftreten und seine Chronizität gekennzeichnet ist, ist die chirurgische Versorgung. So konnten MORGAN und ABRAMS (1994) zeigen, dass die chirurgische Therapie im Vergleich zu diversen konservativen Therapiemethoden höhere Heilungsraten erzielte. Zur Anwendung kommen beim Hund vor allem die oberflächliche Punktkeratotomie sowie die Grid-Keratotomie. Vor beiden Eingriffen sollte eine lokale Anästhesie der betroffenen Hornhaut durchgeführt werden.

Bei der Punktkeratotomie wird die Hornhaut im Bereich des Ulcus sowie 1-2 mm im gesunden Epithel mit Nadelstichen einer 20 Gauge starken Kanüle im Abstand von 0,5-1 mm zueinander versehen. Dabei ist darauf zu achten, die Kornea nicht zu perforieren. Loses Epithel wird mit einem trockenen Stabtpuffer abgetragen. Die Erfolgsraten dieser Technik liegen beim Hund mit kornealen Ulzerationen zwischen 72 und 88 % (CHAMPAGNE und MUNGER 1992, MORGAN und ABRAMS 1994). Die Grid-Keratotomie ist eine Abwandlung der Punktkeratotomie (GELATT 1999). Hierbei werden im Gegensatz zu dieser oberflächliche Schnitte, die ein Gitter bilden sollen, im Abstand von 1mm in die Hornhaut eingebracht. Es kommt die Kante einer 25 Gauge starken Kanüle zum Einsatz. Eine weitere Option stellt die oberflächliche Keratektomie dar. Diese Technik muss laut dem Autor in Allgemeinanästhesie durchgeführt werden und kann bei unzureichendem Erfolg der beiden erst genannten Methoden eingesetzt werden. Loses Epithel sowie darunter liegend pathologisch verändertes oberflächliches Stroma werden entfernt. Es kommt nach PEIFFER R., GELATT K., GWIN R. (1976) in aller Regel zu einer raschen Heilung des Ulcus.

Für infizierte, einschmelzende oder nicht-heilende chronische Ulzera stellen die konjunktivalen Verschiebeplastiken beziehungsweise Transplantationen von Konjunktiva die häufigsten chirurgischen Therapieformen dar (GELATT 1999). Die positiven Eigenschaften sind laut Aussage des Autors die gewebliche Unterstützung der Hornhaut, eine direkte Blutgefäßversorgung, der Eintrag von epithelialen Zellen und Fibroblasten sowie die anti-kollagenolytischen Eigenschaften. Die Vorteile einer partiellen konjunktivalen Plastik im Vergleich zu einer Nickhautschürze sind die bessere Kontrollierbarkeit der Heilung beziehungsweise einer möglichen Verschlechterung sowie die vereinfachte Applikation von Medikamenten. Eine Nickhautschürze kann nach Aussagen des Autors die Penetration eingegebener Medikamente behindern sowie den Kontakt zwischen Ulcus und Entzündungsprodukten steigern. Auch nach TUNTIVANICH et al. (2001) ist die Penetration von Medikamente an den gewünschten Ort der Wirkung bei einem konjunktivalen Flap

verbessert. Nach GELATT (1999) muss vor der Durchführung eines konjunktivalen Schwenklappens das Wundbett ausreichend vorbereitet werden. Das Ulcus sollte zum Beispiel mit einem Wattetupfer gereinigt und nekrotisches Material abgetragen werden. WILKIE und WHITTAKER (1997) empfehlen eine Keratektomie, um infektiöses Stroma zu entfernen und so ein gesundes Wundbett zu schaffen.

Unter den konjunktivalen Plastiken kommt der konjunktivale bulbäre Rotationslappen beim Kleintier am häufigsten zur Anwendung. Er erlaubt einen direkten Epithel- zu Epithelkontakt zwischen Kornea und Konjunktiva. Eine Abwandlung dieses Rotationslappens ist der Brückenlappen. Er besitzt zwei Arme für die Blutgefäßversorgung und ist deshalb für Bulbi großer Tiere gut geeignet. Zu berücksichtigen ist allerdings eine eher mäßige Wund- zu- Wundapposition. Neben diesen existieren noch weitere konjunktivale Transplantationsmöglichkeiten. So ist der 360° Lappen zu nennen, welcher allerdings die Kornea vollständig abdeckt und somit die gleichen Nachteile wie die Nickhautschürze aufweist. Des Weiteren ist keine appositionelle Naht zwischen Konjunktiva und Kornea möglich, weshalb es häufig zur Ausbildung von Dehiszenzen kommt. Bei einem 180° Lappen ist zwar die Eingabe von Medikamenten sowie die Sicht erleichtert, eine appositionelle Naht ist jedoch auch hier nicht möglich. Ein palpebraler konjunktivaler Lappen sollte nach GELATT und GELATT (1995) nur verwendet werden, wenn die bulbäre Konjunktiva beispielsweise aufgrund einer Erkrankung nicht zur Verfügung steht. Der offensichtliche Nachteil dieser Plastik ist die Verbindung des konjunktivalen Lappens mit dem Lid woraus eine ständige Bewegung resultiert. Als Konsequenz daraus sollte zusätzlich eine temporäre Tarsorrhaphie durchgeführt werden. Da es hierbei wiederum zu einer Abdeckung der Ulzeration kommt, ist diese Art der Transplantation nach WILKIE und WHITTAKER (1997) nicht zu empfehlen.

Eine weitere Option stellt die freie Transplantation von konjunktivalem Gewebe dar. Für diese Technik kann sowohl bulbäre als auch palpebrale Konjunktiva verwendet werden. Im Unterschied zu den anderen Transplantaten besitzt sie keine eigene Blutgefäßversorgung und sollte laut den Autoren dieses Artikels nur Verwendung finden, wenn ein anderer konjunktivaler Lappen nicht möglich, das Ulcus nicht infiziert und noch ein Teil Stroma im Defekt vorhanden ist. Bei allen Formen von konjunktivalen Verschiebeplastiken oder Transplantationen kommt es, wie in Abbildung 3 zu sehen ist, immer zu einer gewissen Lichtundurchlässigkeit der Hornhaut und so zu einer Minderung des Sehvermögens. (GELATT und GELATT 2011).

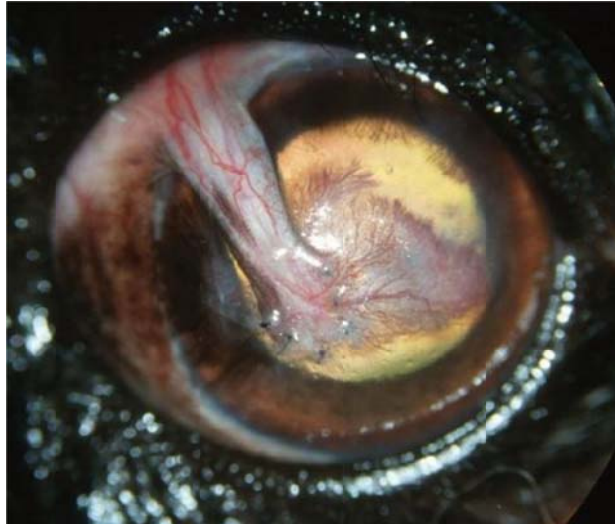


Abbildung 3: Eingehelte bulbäre konjunktivale Verschiebeplastik bei einem Hund. Quelle: A. Steinmetz, Klinik für Kleintiere, Universität Leipzig.

2.1.5 Die Hornhauttransplantation (Keratoplastik)

Die Hornhauttransplantation ist eine weitere Möglichkeit korneale Defekte chirurgisch zu versorgen. Die hauptsächlichen Indikationen beim Kleintier sind laut GELATT und GELATT (2011) tiefe stromale, die Descemetsche Membran betreffende sowie endotheliale Läsionen der Hornhaut. Die verschiedenen Techniken der Keratoplastik werden nach der Herkunft der verwendeten Hornhaut und der Höhe des Transplantates eingeteilt. So unterscheidet man nach den Autoren autologe, homologe und heterologe Transplantationsformen. Hier stammen die Spenderhornhäute vom Empfängertier selbst, der gleichen Spezies aber von einem anderen Tier beziehungsweise einer anderen Spezies.

Bei der Art der Keratoplastik unterscheidet man die anteriore und posteriore lamelläre sowie die Vollschichtkeratoplastik. Während bei der anterioren Keratoplastik das korneale Epithel sowie der vordere Anteil des Stromas verwendet werden, kommt bei der posterioren Keratoplastik der hintere Anteil des Stromas bei einer Transplantation zum Einsatz. Bei der Verwendung von autologem Gewebe kommt in der Regel eine lamelläre Verschiebe- oder Rotationsplastik, wie in Abbildung 4 gezeigt, zur Anwendung.

Speziell beim Kleintier werden die Keratoplastiken noch etwas genauer unterteilt. So unterscheidet man hier die autologen lamellären Verschiebeplastiken, die homologen lamellären Transplantate, die autologen rotationellen Vollschichtplastiken sowie die homologen Vollschichttransplantate. Eine der möglichen Komplikationen ist die Abstoßungsreaktion des Empfängers gegenüber der transplantierten Kornea. Diese äußert sich in einer Entzündung mit Vaskularisation, Ödematisierung sowie einer möglichen Trübung des Transplantates und damit einer Einschränkung oder Verlust des Visus (GELATT und GELATT 2011).

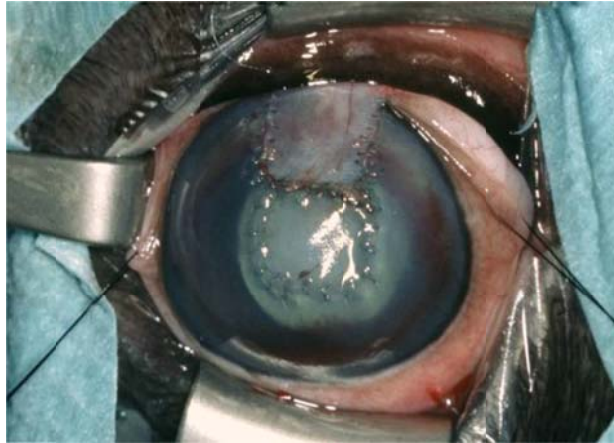


Abbildung 4: Kerato-konjunktivale Verschiebeplastik zur Deckung eines kornealen Ulcus beim Hund. Quelle: A. Steinmetz, Klinik für Kleintiere, Universität Leipzig

2.1.6 Wundheilung der Kornea

Die korneale Wundheilung besteht aus einer komplexen Abfolge zellulärer Reaktionen, welche durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine gesteuert werden. Die Faktoren der Hautwundheilung stimmen mit denen der kornealen Wundheilung weitgehend überein. Je nachdem wie sehr die Hornhaut geschädigt ist, kommt es zu unterschiedlichen Reaktionen der Zellen des Epithels, des Stromas und des Endothels um die Integrität der selbigen wieder herzustellen (IMANISHI et al. 2000, AHMADI und JAKOBIEC 2002, YU et al. 2010, LJUBIMOV und SAGHIZADEH 2015).

2.1.6.1 Epithelheilung

Nach BUKOWIECKI et al. (2017) stellt das Epithel die äußerste Schicht der Kornea dar, welche externen Einflüssen am stärksten ausgesetzt und somit am empfänglichsten für Verletzungen ist. Um tiefere Schichten beispielsweise vor Infektionen zu schützen, kommt es in der Regel zu einer schnellen Heilung des Epithels, sodass kleine Defekte innerhalb von 24 Stunden bereits wieder geschlossen sind. Nach den Autoren kommt es durch ein Trauma und Apoptose von verletzten Epithelzellen zu einer Ablösung von der Basalmembran. Daraufhin kommt es an den Wundrändern zu einer Abflachung und Migration von dort liegenden Epithelzellen. Die Zellen wandern in Richtung der Mitte des entstandenen Defektes und bilden durch Zell-Zell-Verbindungen wieder eine geschlossene Decke. Weiterhin kommt es durch Proliferation und Differenzierung von Basalzellen zu einer vollständigen Wiederherstellung des Zellverbandes. Die epitheliale Migration wird durch eine vorübergehende extrazelluläre Matrix, die unter anderem aus Fibrin, Fibronectin und Hyaluronsäure besteht erleichtert (BUCK 1982, ZIESKE 2001). Um sich an der Unterlage zu befestigen, bilden die Epithelzellen am Ende der Heilungsphase neue Hemidesmosomen aus (ZIESKE 2001).

Am Heilungsprozess des kornealen Epithels sind laut SPADEA et al. (2016) viele Wachstumsfaktoren wie der transforming growth factor (TGF), epithelial growth factor (EGF),

hepatocyte growth factor (HGF) sowie der keratinocyte growth factor (KGF) beteiligt. Des Weiteren sind korneale Nervenendigungen für die Regeneration des Epithels unterstützend tätig (MÜLLER et al. 2003). Durch die Steuerung des Blinzeln, wird der Umsatz von kornealen Epithelzellen reguliert. Außerdem stellen sie epitheliotrope Substanzen wie beispielsweise Substanz P, Calcitonin gene-related peptide (CGRP) und nerve growth factor (NGF) bereit und verbessern so ebenfalls die Regeneration (REID et al. 1993, MIKULEC und TANELIAN 1996, LAMBIASE 2000). Kommt es zu einer Degeneration der kornealen Innervation (neurotrophe Keratitis), ausgelöst zum Beispiel durch eine Virusinfektion oder eine Schädigung des Nervus trigeminus (MÜLLER et al. 2003), zeigen die Patienten häufig eine verzögerte korneale Wundheilung sowie daraus resultierende Ulzerationen mit der Gefahr einer Perforation mit Eintritt von Bakterien ins Augeninnere. Die topische Gabe von NGF führt zu einer schnelleren Epithelheilung und wurde in klinischen Studien sowohl für die Therapie der neurotrophen Keratitis, der Keratokonjunktivitis sicca als auch zur Verbesserung der nervalen Regeneration nach Kataraktoperationen getestet (LAMBIASE et al. 1998, LAMBIASE 2000).

2.1.6.2 Stromale Wundheilung

Nach dem Auftreten eines epithelialen Defektes kommt es in kurzer Zeit zur Apoptose von im Stroma gelegenen Keratozyten neben dem Wundrand (WILSON et al. 2001, AMBRÓSIO et al. 2009). Dieser Vorgang wird durch Zytokine wie $\beta 1$ (IL-1) (WILSON et al. 1996), FAS-Ligand (MOHAN et al. 1997) und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) (MOHAN et al. 2000), die von geschädigten Epithelzellen ausgeschüttet werden ausgelöst. Die restlichen Keratozyten werden aktiviert und wandeln sich zu Fibroblasten, welche innerhalb von 24 Stunden nach dem Trauma in Richtung des Defektes migrieren (ZIESKE 2001). Die Fibroblasten ordnen sich parallel zu den unterliegenden Kollagenbündeln an, sodass diese den Fibroblasten als Leitstrukturen dienen (PETROLL et al. 2015).

Sowohl die Migration als auch die Aktivierung der Fibroblasten wird durch zahlreiche Wachstumsfaktoren gesteuert. So sind der TGF, platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor-2 (FGF-2) und EGF bei der Regulation der stromalen Heilung beteiligt (JESTER et al. 1997, JESTER und HO-CHANG 2003). TGF und PDGF spielen insbesondere bei der Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten, welche sich in stromalen Wunden vollzieht, eine wichtige Rolle (JESTER et al. 1999a, JESTER et al. 2002). Die besondere Eigenschaft der Myofibroblasten ist die Ausbildung von glatten Muskelfasern, welche der Wunde dazu verhelfen sich durch Kontraktion zu verkleinern und zu schließen (JESTER et al. 1995, TOMASEK et al. 2002). Weitere Eigenschaften der Myofibroblasten sind die Expression von Vimentin und Desmin sowie eine verminderte Transparenz der Zellen im Vergleich zu nicht aktivierten und differenzierten Keratozyten (JESTER et al. 1999b, CHAURASIA et al. 2009). Die Myofibroblasten entstehen laut BARBOSA et al. (2010) und SINGH et al. (2012) nicht nur durch Proliferation und Differenzierung okulärer stromaler Fibroblasten, sondern haben zu einem großen Teil auch

Zellen des Knochenmarks als Vorläufer, die zur Hornhaut des Auges transportiert werden. Nachdem die stromale Wunde durch Myofibroblasten und Fibroblasten vollständig verschlossen ist, nimmt die Anzahl der Myofibroblasten langsam ab. Dieser Umbauvorgang des Stromas dient der Wiederherstellung der Transparenz der Kornea und kann mehrere Jahre andauern. Während des Umbaus des Stromas wird außerdem die eher ungeordnete Reparaturmatrix durch die normale korneale extrazelluläre Matrix ersetzt.

2.1.6.3 Endothelheilung

Da die Teilungsfähigkeit der Endothelzellen nahezu gegen Null tendiert, basiert die Heilung des Endothels vor allem auf der Neuordnung der verbliebenen Zellen sowie deren Vergrößerung (BUKOWIECKI et al. 2017). Laut diesen Autoren erlangen die Zellen nach Deckung des endothelialen Defektes innerhalb weniger Tage ihre Pumpeigenschaften wieder und produzieren eine neue Basalmembran. Nach einem Trauma des Endothels kann es bei den endothelialen Zellen zu einer mesenchymalen Umformung (endothelial mesenchymal transition = EnMT) kommen. Im Zuge dieses Vorgangs bilden die Endothelzellen Fibroblasten ähnliche Eigenschaften mit Teilungsfähigkeit aus. Außerdem kommt es laut den Autoren durch die EnMT zur Ablagerung von fibröser extrazellulärer Matrix (ECM) hinter der Descemetischen Membran. Diese wird auch retrokorneale fibröse Membran genannt und führt zu einem Verlust der kornealen Transparenz (MIYAMOTO et al. 2010).

Zusammenfassend ist also zu sagen, dass es vor allem bei tieferen kornealen Defekten, die das Stroma, die Descemetische Membran oder das Endothel betreffen, bei abgeschlossener Wundheilung zu einer Dezipierung oder gar einem Verlust der kornealen Transparenz kommen kann. Des Weiteren münden die meisten der aufgeführten chirurgischen Methoden ebenfalls zu einer gesteigerten oder vollständigen Opazität der Hornhaut und damit zu einem partiellen oder kompletten Visusverlust. Die Transplantation von Amnionmembran stellt hier einen vielversprechenden Lösungsansatz für dieses Problem dar.

2.2 Das Amnion

Das Amnion ist eine der drei Fruchthüllen beim Säugertier und stellt die innerste Eihaut dar. Sie geht aus dem Ektoderm sowie dem parietalen Blatt des Mesoderms hervor. Sie bildet die Amnionhöhle in deren Inneren sich der Fetus in der vom Amnionepithel und vom Fetus selbst produzierten Amnionflüssigkeit befindet. Die Amnionmembran und die Amnionflüssigkeit bilden so ein schützendes Wasserkissen um den Fetus. Die AM umgibt ebenfalls den Fetus selbst und bildet am Übergang vom Körper zum Nabel die Amnionscheide, welche den Nabelstrang umgibt (SCHNORR und KRESSIN 2001, SCHNEIDER et al. 2016, SCHNEIDER et al. 2016).

2.2.1 Anatomischer Aufbau beim Fleischfresser

Wie in Abbildung 5 dargestellt, ist das Amnion als innerste Fruchthülle von der Allantois vollständig umwachsen, so dass der Fetus durch zwei Fruchthüllen vor äußeren Einflüssen geschützt ist. Die AM und das Chorion, die äußerste Fruchthülle, stehen nicht in direktem Kontakt zueinander. Die Geburt eines Welpen kann folglich in einer intakten Amnionmembran stattfinden. Beim Hund kommt es durch einen unvollständigen Gewebsabbau auf maternaler Seite zu der Ausbildung einer Vollplazenta (Placenta decidua). Hier entsteht ein inniger Kontakt zwischen dem Chorion auf der fetalen und dem Endometrium auf der maternalen Seite. Durch den Abbau des Uterusepithels haben die Zotten des Chorions direkten Kontakt zum Endothel der maternalen Gefäße des Uterus (Placenta endothelio-chorialis). Zur Ausbildung von Zotten des Chorions kommt es allerdings nur in einem bestimmten gürtelförmigen Areal. So entsteht eine Placenta zonaria (WEHREND 2013).

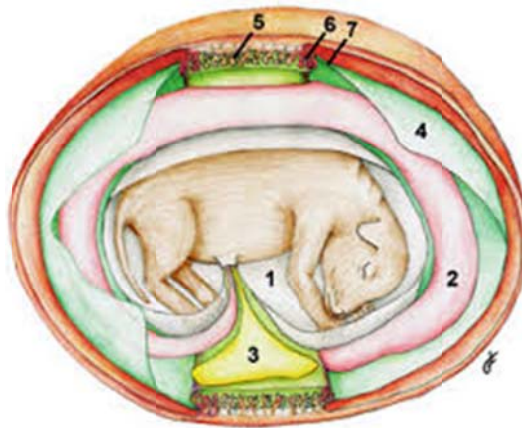


Abbildung 5: Fruchthüllen des Hundes. 1: Amnion, 2: Allantois, 3: Dottersack, 4: Chorion, 5: Gürtelplazenta: Plazentalabyrinth, 6: Paraplazenta: Randhämatom, 7: Paraplazenta: Extravasatzone. Quelle: WEHREND (2013)

2.2.2 Histologischer Aufbau

Die AM ist unabhängig von der Spezies in drei Hauptschichten aufgebaut. Dem Fetus zugewandt findet sich die Epithelschicht. Darauf folgen die Basalmembran (BM) und die mesenchymale Zellschicht, auch Stroma genannt (FAVARON et al. 2015). Das Stroma ist nochmals in drei verschiedene Zonen unterteilt. So fügen sich der Basalmembran von innen nach außen die Kompaktschicht, die Fibroblastenschicht sowie die Schwammschicht an (MALHOTRA und JAIN 2014).

Das Epithel besteht aus einer Schicht kubisch geformter Zellen, welche auf ihrer Zelloberfläche Mikrovilli tragen, die an den seitlichen Zellgrenzen interzelluläre Kanäle bilden, die die benachbarten Zellen miteinander verbinden. Die Epithelzellen sind untereinander über Desmosomen und mit der Basalmembran über Hemidesmosomen verbunden. Der zentral liegende Zellkern zeigt in der Regel eine konstante Größe, seine Kontur ist jedoch un-

regelmäßig begrenzt. Im Zytoplasma der Epithelzellen befinden sich Zellorganellen wie das Endoplasmatische Retikulum und der Golgiapparat (VERSEN-HÖYNCK et al. 2004b).

Die Basalmembran, deren Bausteine von den Amnionepithelzellen sezerniert werden, vereint unterschiedliche Bindegewebstypen in sich. So sind Kollagen Typ III und IV und als nicht kollagene Bestandteile die Glykoproteine Laminin, Nidogen sowie Fibronectin maßgeblich an der Bildung der BM beteiligt.

Die innerste Schicht des Stromas (Kompaktschicht) steht durch die Kollagene V und VI über filamentöse Verbindungen in engem Kontakt mit der Basalmembran und sorgt für die Reißfestigkeit der AM. Die Kompaktschicht ist nahezu zellfrei und besteht vor allem aus parallel angeordneten Kollagenfaserbündeln des Typs I und III (PARRY und STRAUSS 1998). Die Fibroblastenschicht ist die dickste Schicht des Amnions und besteht vor allem aus Fibroblasten, die sich in einem lockeren Netzwerk aus Kollagen mit einigen Glykoproteinen befinden (PARRY und STRAUSS 1998, DUA et al. 2004). Die äußerste Schicht des Stromas, die Schwammschicht, bildet die Grenze zwischen Amnion und Chorion, welche beim Mensch direkt aneinander liegen (BENIRSCHKE et al. 2013, ULFIG und BRAND-SABERI 2017). Beim Fleischfresser bildet sie die Grenze zur Allantois (SCHNORR und KRESSIN 2001). Sie besteht aus einem nicht-fibrillären Netzwerk aus überwiegend Kollagen des Typ III sowie Proteoglykanen und Glykoproteinen, in das vereinzelt Fibroblasten eingestreut sind (BOURNE 1962, PARRY und STRAUSS 1998, NIKNEJAD et al. 2008). Sie enthält ebenfalls Muzine und ist in der Lage, sich durch Wassereinlagerungen in ihrer Größe zu verdoppeln. So kann das Amnion beim Mensch frei über das darunterliegende Chorion gleiten (VERSEN-HÖYNCK et al. 2004b).

Vergleicht man die strukturellen Eigenschaften der AM, der Kornea sowie der Konjunktiva, so fällt auf, dass die Basalmembran des Epithels aller drei Strukturen die Kollagene Typ IV, V, VII sowie Fibronectin und Laminin enthält. Jedoch ähnelt die Zusammensetzung der BM des Amnions eher der konjunktivalen als der kornealen BM. Dies zeigen Untersuchungen von Seitenketten des Kollagens Typ IV und Laminin (FUKUDA et al. 1999).

2.3 Eigenschaften der Amnionmembran

2.3.1 Antiinflammatorische sowie Narben reduzierende Eigenschaften

Für die antiinflammatorischen und Narben reduzierenden Eigenschaften der Amnionmembran gibt es mehrere Mechanismen. Bei einer physiologisch ablaufenden Entzündungsreaktion kommt es durch Makrophagen zur Produktion von Zytokinen, die über das Transforming growth factor β -System zu einer Fibrosierung des Gewebes führen. TSENG et al. (1999) konnten zeigen, dass die AM die Expression des TGF- β und folglich

die Fibroblastendifferenzierung zu Myofibroblasten reduziert. Dies führt zu einer Reduktion der Narbenbildung. Zu diesem Ergebnis kommen auch LEE et al. (2000).

Weiterhin konnten HAO et al. (2000) feststellen, dass sowohl Epithelzellen als auch mesenchymale Zellen der AM antiinflammatorische Zytokine wie Interleukin-10 (IL-10) und Interleukin-1 Rezeptor Antagonist (IL-1RA) exprimieren. SOLOMON et al. (2001) wiesen nach, dass es durch die Anwesenheit stromaler Matrix der AM zu einer deutlichen Reduktion der Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 alpha (IL-1 α) und Interleukin-1 beta (IL-1 β) unter dem Einflusses von Lipopolysacchariden kommt. So erklären sie die geminderte Entzündungsreaktion der Augenoberfläche nach erfolgter Amniontransplantation. Eine weitere antiinflammatorische Eigenschaft der AM ist die Aufnahme von Entzündungszellen und Überführung dieser in die Apoptose (SHIMMURA et al. 2001). Nach HIGA et al. (2005) induziert die Hyaluronsäure, welche sich im Stroma der AM befindet, diese Aufnahme von Entzündungszellen wie Lymphozyten über eine Bindung an den CD44-Rezeptor. Außerdem wurden in der AM natürliche Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen (MMPs), die normalerweise die Migration von Granulozyten und Makrophagen in entzündliche Prozesse unterstützen, gefunden (HAO et al. 2000, KIM et al. 2000).

2.3.2 Reepithelisierung

Aufgrund ihres positiven Einflusses auf die Epithelisierung, kommt die humane Amnionmembran in der Humanmedizin bereits bei zahlreichen chirurgischen Eingriffen zum Einsatz (TRELFOED und TRELFOED-SAUDER 1979). YANG et al. (2006) konnten zeigen, dass Hauttransplantate mit AM Transplantaten ohne AM in Bezug auf die Keratinozytenproliferation - und Migration überlegen waren. Es handelte sich hier um deepithelisierte Amnionmembranen, sodass die Autoren den Effekt der verbesserten Epithelisierung durch Zellanheftung,- proliferation,- differenzierung- und migration auf die Komponenten der Basalmembran zurückführen. Einige Autoren machen die strukturellen Ähnlichkeiten der Basalmembranen von Kornea und AM für die reepithelisierenden Eigenschaften des Amnions verantwortlich (VAN HERENDAEL et al. 1978, MODESTI et al. 1989). Die Amnionepithelzellen produzieren die Bestandteile der Basalmembran zu denen wie oben beschrieben Kollagen Typ III, IV sowie die nicht kollagenen Glykoproteine Laminin, Nidogen und Fibronectin gehören. Diese dienen als Liganden von Oberflächenrezeptoren anderer Zellen und ermöglichen so die Zelladhäsion und Signaltransduktion und fördern so die Epithelisierung (LO und POPE 2009). Einen weiteren Erklärungsansatz liefert die Studie von KOIZUMI et al. (2000). Hier beleuchten die Autoren die Expression und Konzentration bestimmter Wachstumsfaktoren, die für die Epithelisierung wichtig sind, sowie deren genaue Lokalisation in der AM. So fanden diese Autoren hohe Konzentrationen von EGF, KGF, HGF und bFGF in Amnionmembranen mit im Vergleich zu Amnionmembranen ohne Epithel. Sie schließen daher auf einen epithelialen Ursprung der Wachstumsfaktoren.

2.3.3 Immunmodulatorische Effekte

Die Antigenität der AM wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Im Vergleich zum Chorion, welches eine erwiesene Antigenität aufweist, zeigt das Amnion laut AKLE et al. (1981) und TRELFOED und TRELFOED-SAUDER (1979) eine geringere Antigenität. Die geringe oder fehlende Antigenität der AM erklären ADINOLFI et al. (1982) durch die fehlende Expression von Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC). Diese werden normalerweise von jeder Zelle auf ihrer Oberfläche exprimiert um zelluläre oder phagozytierte Antigene dort zu präsentieren (ENGELHARDT und BREVES 2000). Sie spielen eine wichtige Rolle in der Transplantationsmedizin (ALEGRE et al. 2016, BERTAINA und ANDREANI 2018). Durch ihr Fehlen auf der Zelloberfläche wird eine körperfremde Zelle vom Immunsystem nicht als fremd erkannt und es erfolgt keine Abstoßungsreaktion. So konnten AKLE et al. (1981) zeigen, dass es bei der Transplantation eines Stückes AM unter die Haut bei keinem der freiwilligen Probanden zu einer Abstoßungsreaktion kam. HORI et al. (2006) konnten hingegen auf frischem Amnionepithel MHC der Klasse I nachweisen. Des Weiteren kam es in dieser Studie durch die Transplantation von frischem allogenen Amnionepithel auf die Hornhaut von Mäusen zu einer Sensibilisierung des Empfängers sowie zu akuten Abstoßungsreaktionen bei erneuter Transplantation von frischem Amnionepithel bei den sensibilisierten Empfängern. Auch GABLER und LOHMANN (2000) berichteten von einem Patienten mit einem kornealen Ulcus, bei dem es nach dreimaliger Amniontransplantation vom gleichen Spender bei der zweiten und dritten Übertragung zu einem Hypopyon kam. Die Autoren führen dies auf eine immunbedingte Abstoßungsreaktion zurück.

Die Antigenität der AM wird möglicherweise durch Glycerin- und Kryopräservierung gemindert (MARAL et al. 1999). So führen auch KALPRAVIDH et al. (2009) die ausbleibenden Abstoßungsreaktionen bei den Hunde ihrer Studie eher auf die Kryopräservierung mit Glycerin und die damit verbundenen avitalen Zellen zurück. In dieser Studie erfolgte eine AM- Transplantation nach Exzision von korneolimbalen Dermoiden bei sieben Augen von sieben Hunden.

2.3.4 Einfluss auf die Angiogenese

Eine optimale Wundheilung hängt, neben anderen Einflüssen, von einem ausbalancierten Verhältnis von pro- und antiangiogenetischen Faktoren ab. Die Epithelisierung wird durch proangiogenetische Faktoren begünstigt, während die antiangiogenetischen Faktoren pathologische strukturelle Umbauprozesse (Remodeling) des Gewebes verhindern (LO und POPE 2009). Der Einfluss auf die Gefäßneubildung durch die AM wird in der Literatur ebenfalls kontrovers diskutiert. Zum einen wurden in der AM antiangiogenetische Faktoren wie Thrombostatin-1, Endostatin sowie alle vier Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen (TIMP-1, 2, 3 and 4) nachgewiesen, die von den Epithelzellen und den mesenchymalen Zellen der AM produziert werden (HAO et al. 2000), zum anderen wurde in früheren

Studien die avaskuläre Struktur der AM ihrem antiangiogenetischen Effekt zugrunde gelegt (BURGOS 1983). Auf der anderen Seite konnte in anderen Studien die Expression von proangiogenetischen Faktoren wie dem vascular endothelial growth factor (VEGF) im Amnionepithel und dem basic fibroblast growth factor (bFGF) nachgewiesen werden (MIGNATTI et al. 1989, BOGIC et al. 2000, KOIZUMI et al. 2000). Zum jetzigen Zeitpunkt und unter dem Gesichtspunkt einer verbesserten Wundheilung liegt der Fokus jedoch eher auf der antiangiogenetischen Wirkung der AM. So zeigt beispielsweise der Pigment epithelium-derived factor (PEDF), welcher in der Basalmembran der AM exprimiert wird ebenfalls einen antiangiogenetischen Effekt (SHAO et al. 2004).

2.3.5 Antimikrobielle Eigenschaften

In verschiedenen Studien konnten die antimikrobiellen Eigenschaften der Amnionmembran dargestellt werden. Im Rahmen einer Untersuchung von Brandwunden konnten ROBSON und KRIZEK (1973) feststellen, dass es bei Wunden, welche mit Amnion abgedeckt worden waren zu einer geringeren bakteriellen Besiedlung kam als bei der Kontrollgruppe ohne AM-Abdeckung. Zudem wurden in der Amnionflüssigkeit zahlreiche antimikrobiell wirksame Substanzen wie Lysozym, Transferrin, Peroxidase, 7S-Immunoglobulin und Allantoin nachgewiesen. Diese finden sich allerdings nicht in der AM selbst, sondern nur in der Amnionflüssigkeit (GALASK und SNYDER 1970). Antimikrobielle Peptide des angeborenen Immunsystems wie beta-Defensine werden dagegen von der AM selbst exprimiert. So konnten MAO et al. (2017) zeigen, dass deren Expressionslevels positiv mit der antimikrobiellen Aktivität der AM korrelieren. Außerdem wurde eine direkte Wirksamkeit der beta-Defensine 2 und 3, die von der AM sezerniert werden, gegenüber *P. aeruginosa*, der bei kornealen Ulzerationen zu einer rasanten Progression führt (MICHAEL et al. 2016), nachgewiesen. Auch IL-1RA und Laktoferrin, die beide von der AM gebildet werden, haben sowohl antibakterielle als auch antiinflammatorische Eigenschaften (HAO et al. 2000, KANYSHKOVA et al. 2001). Es existieren Hinweise, dass in vitro eher die Wundabdeckung durch ein biologisches Substrat zu einer geringeren bakteriellen Besiedlung führt als die Abgabe antimikrobieller Substanzen (TALMI et al. 1991). So führt eine gute Adhäsion der AM an die Wunde zu einer Minimierung der externen Kontamination, sodass der Organismus weniger Bakterien, die potenziell zu einer Sekundärinfektion führen könnten, bekämpfen muss (LO und POPE 2009). ANDONOVSKA et al. (2008) führen das Verhindern einer invasiven bakteriellen Infektion über die Wunde auf die Beschleunigung der Reepithelisierung durch die AM zurück. Des Weiteren wird die Beurteilung der Wunde und die Detektion eitriges Sekretes durch die Transparenz der AM erleichtert, sodass die Wundauflage bei ungünstigem Wundmilieu eher gewechselt wird (GAJIWALA und GAJIWALA 2004).

2.3.6 Analgetische Wirkung

Bei der Verwendung von AM als biologische Wundauflage, zeigen die Patienten deutlich weniger Schmerzen. Wie es zu dieser Reduktion kommt, ist noch weitgehend unklar. Ein möglicher Erklärungsansatz ist der geminderte Kontakt zwischen der Wunde und der äußeren Umgebung sowie die daraus resultierende Abdeckung der sensiblen Nervenendigungen (MARTÍNEZ PARDO et al. 1999). Weiterhin kann durch die Anwendung von AM die Anzahl der Verbandswechsel, die häufig mit Schmerzen verbunden sind, reduziert werden (LEY-CHÁVEZ et al. 2003, BRANSKI et al. 2008).

2.3.7 Mechanische Eigenschaften

Durch die hohe Reißfestigkeit der AM, ist sie in der Lage den mechanischen Stress der Transplantation unbeschadet zu überstehen. Sie ist dünn und geschmeidig und passt sich so eng an das Wundbett an (GAJIWALA und GAJIWALA 2004). Neben der Reißfestigkeit zeichnet sich das Amnion ebenfalls durch seine Elastizität aus, die nach HIEBER et al. (1997) wahrscheinlich durch das Strukturprotein Elastin bedingt wird. Zudem arbeitet die AM wie eine biologische Wundauflage und schirmt das neu gebildete Epithel von äußeren Einflüssen ab. So wird es zum Beispiel bei der Anwendung am Auge vor Reibungskräften, die durch das Blinzeln verursacht werden, geschützt (BAUM 2002). Dieser Aspekt spielt laut MALHOTRA und JAIN (2014) insbesondere dann eine Rolle, wenn Lidpathologien wie zum Beispiel ein Entropium oder eine Trichiasis vorliegen, die zu einer Traumatisierung des neuen empfindlichen Epithels führen können.

2.3.8 Permeabilität

Die AM ist in der Lage ihren Flüssigkeitsaushalt zu regulieren und ist permeabel für Gase. Sie verhindert den Verlust von Flüssigkeit, Elektrolyten, Proteinen, Wärme und Energie (REJZEK et al. 2001). YOSHITA et al. (2004) konnten den hohen Wasseranteil der AM sowie ihre Sauerstoffpermeabilität zeigen. So kommt es bei der Verwendung von Amnion als Wundauflage durch eine gerichtete Diffusion zu einer Anreicherung von Feuchtigkeit und Sauerstoff in der Wunde und damit zu einer beschleunigten Heilung (LO und POPE 2009). Durch ein feuchtes Wundmilieu kommt es zu einer schnelleren Epithelisierung, während es in einer trockenen Wunde zu einer Nekrose des neuen Gewebes kommen kann (SEDLARIK 1993, WOLLINA 1995). Auch ein hohes Sauerstoffangebot fördert die Epithelisierung, während es bei niedrigen Sauerstoffpartialdrücken zu einer vermehrten Neovaskularisierung kommt, was besonders auf der kornealen Oberfläche unerwünscht ist (THOMAS 1990, EAGLSTEIN et al. 1991).

2.4 Anwendung der Amnionmembran

2.4.1 Anwendung der Amnionmembran in der Humanmedizin

Die Anwendungsmöglichkeiten der Amnionmembran im medizinischen Bereich sind vielfältig und nehmen stetig an Bedeutung zu. So wurde die Verwendung der AM als Hauttransplantat 1909 von DAVIS zum ersten Mal beschrieben. Kurz darauf verwendete SABELLA 1913 die AM zur permanenten Abdeckung von Brandwund. DOUGLAS (1952) berichtete zum ersten Mal über die Anwendung von Amnion als biologische Wundauflage zur vorübergehenden Wundabdeckung bei der Behandlung von Brandwunden. Aufgrund des gehäufteten Auftretens von Wundinfektionen wurde die Anwendung der AM zunächst ausgesetzt. Zur Zeit ist das Amnion unter den biologischen Transplantaten eines der Beliebtesten zur Unterstützung der Heilung bei unterschiedlichen Erkrankungen wie zum Beispiel schwerwiegenden Wunden nach Verbrennungen oder nicht heilenden Ulzerationen der Haut bei Diabetes mellitus (ANDONOVSKA et al. 2008, BRANSKI et al. 2008, FETTEROLF und SNYDER 2012, PAGGIARO et al. 2018). Weitere Anwendungsgebiete sind unter anderem die vaginale rekonstruktive Chirurgie, der Verschluss abdominaler Hernien, die Prävention von Verklebungen nach operativen Eingriffen, der Perikardverschluss sowie in Anfängen auch in der rekonstruktiven Urologie (MURALIDHARAN et al. 1991, GHARIB et al. 1996, RENNEKAMPPF et al. 2009, KLEIN et al. 2011, RAMUTA und KREFT 2018). Außerdem wird die AM auch in der Mundhöhlen- und Gesichtschirurgie zur Unterstützung der Wundheilung eingesetzt (KESTING et al. 2014). Sie spielt ebenfalls eine bedeutende Rolle in der Ophthalmochirurgie, wo sie beispielsweise zur Behandlung von kornealen Ulzerationen, der limbalen Stammzelldefizienz, der bullösen Keratopathie, des Pterygiums, des Symblepharons, bei Verätzungen, sowie Neoplasien der Hornhaut oder Konjunktiva eingesetzt wird. (LIU et al. 2010, MELLER et al. 2011).

2.4.2 Anwendung der Amnionmembran in der Veterinärmedizin

Die Verbreitung und Anwendung der AM im allgemein chirurgischen Bereich in der Veterinärmedizin ist im Vergleich zur Humanmedizin eher begrenzt. Es existieren einige wenige Studien mit eher kleinen Fallzahlen, die die Wirksamkeit der AM bei der Unterstützung der Wundheilung belegen. Es handelt sich hierbei allerdings in der Regel um experimentelle Studien. So konnten GOODRICH et al. (2000) an Hautwunden der distalen Gliedmaße von Ponies zeigen, dass die mediane Wundheilungsdauer der Wunden mit der Unterstützung von equinem Amnion als Wundauflage signifikant geringer war als bei Wunden mit einer herkömmlichen nicht haftenden Wundauflage. BIGBIE et al. (1991) verglichen die equine AM mit lebenden Hefezellderivaten im Sinne einer biologischen Wundauflage und kamen zu dem Ergebnis, dass bei den Wunden, die mit AM versorgt wurden, der Prozentsatz der Epithelisierung signifikant größer, die Wundheilung signifikant schneller abgeschlossen und die Entstehung und Ausprägung von überschüssigem Granulationsgewebe

signifikant geringer ausgeprägt war. Auch beim Hund existieren Hinweise, dass die AM einen positiven Einfluss auf die Wundheilung hat. Bei einem Vergleich der AM mit drei anderen Wundaufgaben zeigte sich, dass die experimentell angelegten Hautwunden mit equiner AM eine schnellere Wundkontraktion und Epithelisierung aufwiesen (RAMSEY et al. 1995). Es existieren ebenfalls einige Tiermodelle zur Evaluation der AM in der viszeralen rekonstruktiven Medizin. GHAHRAMANI et al. (2014) untersuchten zum Beispiel am Hund den Einfluss von humaner AM auf die Heilung von duodenalen Defekten. Sie fanden zwar keinen Einfluss auf den postoperativen Durchmesser im Vergleich zur Versorgung des Defektes mittels eines herkömmlichen Verschlusses, jedoch waren histologisch weniger Entzündungszeichen und eine bessere Wundheilung feststellbar. FISHMAN et al. (1987) verwendeten humane fetale Häute um an zehn Hunden den erfolgreichen Verschluss eines Defektes der Harnblase zu demonstrieren. ROSHANRAVAN et al. (2014) untersuchten den Einfluss humaner AM auf die Heilung nach operativer Versorgung von rektovaginalen Fisteln bei Hunden. Sie konnten zeigen, dass im Vergleich zu den klassisch verschlossenen Fisteln der mikroskopisch festgelegte Heilungscore in der AM-Gruppe signifikant höher war. Zur Beurteilung wurden die Epithelisierung, die Entzündungszeichen sowie mögliche Ulzerationen und Nekrosen herangezogen.

Die AM kommt in der veterinärmedizinischen Augenheilkunde im Vergleich zur Anwendung in der Allgemein Chirurgie deutlich häufiger zum Einsatz. Das Hauptanwendungsgebiet stellt die Rekonstruktion kornealer Defekte dar. Hier kommen sowohl allogene als auch xenogene Transplantate zur Anwendung. So konnten NAKAMURA et al. (2004) in einer experimentellen Studie die erfolgreiche Transplantation von humaner AM mit autologen kultivierten kornealen Epithelzellen bei acht Kaninchen durch eine abgeschlossene Epithelisierung der Hornhautdefekte nach zehn Tagen demonstrieren. In einer weiteren experimentellen Studie von TSUZUKI et al. (2008) wurde wegen ihrer besseren Verfügbarkeit porcine AM zur Deckung kaniner Hornhautdefekte verwendet. Die Ergebnisse zeigten eine Wiederherstellung der Transparenz und Rückgang der Neovaskularisation der Kornea 40 Tage nach der Transplantation. Auch die histologische Untersuchung der abgeheilten Hornhäute bezüglich der Dicke, der Parenchymzellzahl, der Kollagenfaserdicke sowie des Kollagenfaseranteils, ergab eine annähernd gleiche Zusammensetzung wie die normaler gesunder kaniner Korneae. Auch die Studie von KIM et al. (2009) befasst sich mit der chirurgischen Behandlung kaniner kornealer Läsionen, vor allem von Ulzerationen. Allerdings kam hier bovine gefriergetrocknete AM zum Einsatz. Die Autoren konnten zeigen, dass unter den vier gebildeten Gruppen (I: Kontrollgruppe, II: AM-Transplantation, III: Nickhautschürze, IV: Kontaktlinse) die epitheliale Heilung in der AM-Transplantationsgruppe signifikant höher war, während die Gruppen III und IV in diesem Punkt keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwiesen. Eine weitere experimentelle Studie von WICHAYACOOP et al. (2009) beschäftigte sich mit dem Einfluss topisch angewendeter kultivierter humaner Amnionepithelzellen (HAEC) auf die Entzündungsreaktion kaniner Korneae. Es wurden vier topische Therapien eines induzierten

kornealen Ulkus beim Hund miteinander verglichen. Dazu gehörten die lokale Gabe von Antibiotika, Kortikosteroiden, einem Placebo sowie kultivierten humanen Amnionepithelzellen. Nur in der Gruppe der Kortikosteroide und der HAEC kam es zu einer Senkung der proinflammatorischen Mediatoren IL-1 β und NO. Des Weiteren zeigte sich auch klinisch nur in diesen beiden Gruppen der antiinflammatorische Effekt über eine Reduktion der Konjunktivitiszeichen und der Neovaskularisation. Auch diverse klinische Studien konnten die positive Wirkung der AM zur Behandlung von Hornhautläsionen belegen. Hierbei kommt die AM sowohl als allogenes als auch als xenogenes Transplantat zum Einsatz. So untersuchten OLLIVIER et al. (2006) die Narbenbildung und die damit verbundene Trübung der Hornhaut nach Exzision von korneo-limbale Plattenepithelkarzinomen beim Pferd. Untersucht wurde die Transplantation von equiner AM nach Keratektomie, die bei neun von 11 Augen noch um eine Bestrahlung mit Strontium-90 ergänzt wurde. Die postoperativen Ergebnisse wurden mit Fällen verglichen, die nach Tumorexzision zum Decken des Hornhautdefektes mit einem bulbären Konjunktivalappen versorgt wurden. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass die Narbenbildung bei der Verwendung der AM deutlich geringer ist als bei einem Konjunktivalappen. PLUMMER et al. (2009) konnten anhand einer größeren Fallzahl (58 Augen) die Effektivität der AM als Transplantat bei unterschiedlichen Hornhauterkrankungen wie einschmelzenden Ulzerationen, oberflächlichen okulären Neoplasien sowie der bullösen Keratopathie beim Pferd zeigen. So untersuchten sie retrospektiv die Transparenz der Kornea nach der Behandlung mit equiner AM. Die Transparenz der Kornea und damit der Erhalt des Visus waren nur bei 7 % nicht zufriedenstellend. Eine weitere Indikation für die Verwendung der AM stellt laut BARACHETTI et al. (2010) der korneale Sequester bei der Katze dar. Hier konnte bei fünf von sieben Augen nach Transplantation von equiner AM ein gutes Ergebnis mit minimaler Narbenbildung und guter Transparenz der Hornhaut erzielt werden. Auch die kanine AM wurde bereits zur Deckung kornealer Defekte verwendet. In der Studie von KALPRAVIDH et al. (2009) wurden bei sieben Augen von sieben Hunden große Dermoiden durch eine Keratektomie und Konjunktivektomie entfernt. Diese Defekte wurden mit kaniner AM verschlossen und mit einer Nickhautschürze unterstützt. Alle Augen zeigten acht Wochen nach der Transplantation weder Anzeichen einer Neovaskularisation und Narbenbildung noch einer Beeinträchtigung des Visus. Auch CHOI et al. (2010) berichteten von einer erfolgreichen Behandlung eines sehr großen kornealen Defektes nach Entfernung einer kornealen epithelialen Inklusionszyste mit Hilfe von equiner AM. Es handelte sich hierbei um einen Fallbericht eines Yorkshire Terriers, bei dem 100 Tage post operativ eine leichte Pigmentation und moderate Stromavaskularisation festgestellt werden konnte. Die restliche ophthalmologische Untersuchung einschließlich der Untersuchung des Visus waren aber unauffällig.

2.4.3 Chirurgische Techniken zur Rekonstruktion der Korneaoberfläche

Die AM kann zur Deckung kornealer Defekte mit der epithelialen Seite nach oben oder unten auf der Hornhautoberfläche fixiert werden. Welche Orientierung gewählt wird, sollte von der Indikationsstellung abhängig gemacht werden. Da laut HU et al. (2003) die Reepithelisierung der Hornhautoberfläche eher auf der Basalmembran der AM stattfindet als auf ihrem Stroma, sollte die Transplantation der AM bei Defekten bei welchen sie als Matrix für das Einwachsen konjunktivaler und kornealer Epithelzellen dient, mit dem Epithel beziehungsweise der Basalmembran nach oben gerichtet sein. Eine erfolgreiche Epithelisierung ist jedoch ebenfalls bei einem nach oben ausgerichteten Stroma möglich, da korneale Epithelzellen auch hier die Fähigkeit besitzen, einzuwandern (SEITZ et al. 2006). Zudem ist die stromale Matrix in der Lage Entzündungszellen abzufangen und deren Apoptose einzuleiten (SHIMMURA et al. 2001). Dies führt zu einer Reduktion der Entzündungsreaktion, sodass im Falle einer vorliegenden akuten Entzündung die AM mit der stromalen Seite nach oben als Schutzschicht gegen proinflammatorische Zellen und Zytokine, die der Hornhaut zusätzlich schaden können, genutzt werden kann.

Unter den chirurgischen Techniken haben sich drei Methoden zur Rekonstruktion kornealer Defekte in der Ophthalmologie etabliert. Diese wurden von MALHOTRA und JAIN (2014) in einem Reviewartikel zusammengefasst. Eine davon ist die Inlay- oder Grafttechnik, bei der die AM als Matrix beziehungsweise Gerüst für das Einwachsen epithelialer Zellen dient. Hier wird die AM auf die gleiche Größe des kornealen epithelialen oder stromalen Defekt zugeschnitten und mit dem Epithel beziehungsweise der Basalmembran nach oben gerichtet auf der Kornea mit resorbierbarem Nahtmaterial wie zum Beispiel 10-0 Polyglactin fixiert. Bei dieser Technik sollte das Epithel beziehungsweise die Basalmembran nach oben ausgerichtet sein, da es auf der Basalmembran im Vergleich zu den beiden anderen Schichten der AM, Epithel und Stroma, zu einem stärkeren Einwachsen von Epithelzellen mit einer höheren Vitalität kommt (IRANPOUR et al. 2018). Außerdem verfügt die Basalmembran der AM über antiapoptotische Eigenschaften (BOUDREAU et al. 1995, TSENG 1998), die einen Untergang neu migrierender Epithelzellen verhindern. Das den Defekt umgebende korneale Epithel sollte auf einer Breite von 1-2 mm entfernt werden um ein Einwachsen des neuen Epithels auf der Basalmembran der AM und damit eine Integration des Transplantates in die Empfängerkornea zu ermöglichen. Bei dieser Technik kommt es also folglich zu einem Verschluss des Epithels über der AM (SEITZ et al. 2006). Je nach Tiefe der Läsion kann das Amniontransplantat in einer Schicht oder mehreren Schichten eingelegt werden. Wenn mehrere Schichten zum Einsatz kommen, werden diese auf dem Boden des Defektes platziert und darüber eine einfache Schicht AM an der Kornea fixiert. Auch hier sollte ein 1-2 mm breites Debridement des kornealen Epithels um den Defekt durchgeführt werden. Die zweite Technik ist die Overlay- oder Patchtechnik bei der das verwendete Amnion größer ist als der unterliegende Defekt, sodass das Epithel unter die AM einwächst. Die AM kann also mit der epithelialen oder stromalen Seite nach oben ausgerichtet sein. Die AM wird mit einem 9-0 Vicrylfaden an

der benachbarten Konjunktiva oder Episklera befestigt und kann über eine korneale Tabaksbeutelnaht mit 10-0 Nylon zusätzlich fixiert werden. Bei dieser Technik fungiert die AM als biologische Kontaktlinse und schützt so das neu wachsende Epithel vor den Reibungskräften des Lidschlags. Nach abgeschlossener Heilung löst sich die AM von selbst ab oder wird entfernt. Bei der dritten Technik, auch Sandwichtechnik genannt, handelt es sich um eine Kombination aus den beiden erst Genannten (SEITZ et al. 2006). Der zu behandelnde Defekt wird mit einer oder mehrerer Lagen AM aufgefüllt. Zusätzlich wird der Bereich mit der Overlaytechnik abgedeckt. Das neue Epithel wächst nun unter die oberste Lage AM, aber über den Defekt mit der eingelegten AM. So wirkt das eingelegte Amnion wie ein Transplantat und wird in die Kornea integriert, während das aufgelegte Amnion als biologische Wundabdeckung dient. Für die Fixation der AM am Untergrund kann statt Nahtmaterial auch Fibrinkleber verwendet werden um die Operationszeit zu verkürzen und den Patientenkomfort zu verbessern. Für die jeweilige Technik ist es wichtig, die Ausrichtung der AM zu kennen. In der Regel ist sie auf dem Trägermaterial so aufgelagert, dass das Epithel nach oben gerichtet ist, sodass eine Orientierung leicht fällt. Außerdem kann man die stromale Oberfläche an Hand ihrer Stränge erkennen, die sich mit einem Watteträger oder Pinzette anheben lassen. Die fixierte AM kann zusätzlich durch das Anbringen einer Nickhautschürze mechanisch unterstützt werden (KALPRAVIDH et al. 2009).

2.4.4 Konservierungsmethoden der AM zur kornealen Rekonstruktion

Um die AM über längere Zeit lagern zu können und so deren Verfügbarkeit zu verbessern, wurden mehrere Konservierungsverfahren entwickelt und getestet. Auch um die biologische Sicherheit der AM zu gewährleisten, sollte sie einem konservierenden Verfahren unterzogen werden bevor sie am Patienten zum Einsatz kommt. In dieser Zeit kann sie verschiedenen Untersuchungsmethoden zur Detektion übertragbarer Erkrankungen des Menschen sowie einer mikrobiologischen Untersuchung unterzogen werden. Die optimale Konservierungs- und Lagerungsmethode sollte also zum einen sicher für den Patienten sein, zum anderen aber auch die vorteilhaften Eigenschaften sowie die Gewebestruktur der AM möglichst gut erhalten (THOMASEN et al. 2011). Der Artikel von RIAU et al. (2010) gibt einen Überblick über die verschiedenen Konservierungstechniken und deren Vor- und Nachteile. So kommt die Lagerung in Glycerin 50 % am häufigsten zur Anwendung (KRUSE et al. 2000, PRABHASAWAT et al. 2000, PRABHASAWAT und TESAVIBUL 2001, THOMASEN et al. 2011). Die Aufbewahrung von Hauttransplantaten in Glycerin wurde zum ersten Mal von HERMANS (1989) beschrieben. Durch jahrzehntelange positive Erfahrungen etablierte sich die Aufbewahrung in Glycerin im klinischen Alltag. Obwohl Glycerin laut VAN BAARE et al. (1994) antivirale Eigenschaften hat, handelt es sich dabei jedoch nicht um ein sterilisierendes Medium. Ein weiterer wichtiger Schritt bei der Konservierung stellt das Einfrieren bei hohen Minusgraden von - 70 bis - 80 °C dar (LEE und TSENG 1997). Auch hier hat sich Glycerin durch seine kryoprotektiven Eigenschaften als nützlich erwiesen. Es zählt zu den penetrierenden Kryoprotektiva und sein schützender

Charakter während des Gefrierprozesses beruht auf den kolligativen Eigenschaften und der daraus folgenden Erniedrigung des Gefrierpunktes (HOLT 2000). Durch das Gefrierschutzmittel kommt es zu einer Erhöhung der Osmolarität außerhalb der Zelle. Dies führt zu einem Ausstrom von Wasser aus der Zelle. Das Glycerin strömt nun in die Zelle ein, sodass diese ihre Ausgangsform beibehält (SCHMITZ 2011). Zudem konnten VERSENHÖYNCK et al. (2004b) zeigen, dass die Amnionmembranen, welche in Glycerin konserviert wurden, signifikant dicker waren, als luft- und gefriergetrocknete Membranen. Allerdings geben die Autoren zu bedenken, dass in Glycerin konservierte Präparate vor dem klinischen Einsatz einem Waschprozess unterzogen werden müssen. Der Konservierungsprozess beginnt damit, dass die entnommene Plazenta vor der Lagerung normalerweise in steriler physiologischer Natriumchloridlösung, welche antibiotische Zusätze wie Streptomycin, Penicillin, Neomycin und Amphotericin B enthält, gereinigt wird. Danach folgt die Überführung in das Gefriermedium, welches nach der Beschreibung von LEE und TSENG (1997) zusammengesetzt ist. Hierbei werden Glycerin und Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM) in einem Verhältnis 1:1 gemischt und die AM bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und gelagert. Die AM kann so über mehrere Monate gelagert werden. Mit dieser Konservierungsmethode wurden sowohl in der Humanmedizin als auch in der Tiermedizin sehr gute Erfolge auf dem Gebiet der Amniontransplantation zur Rekonstruktion der Korneaoberfläche erzielt (KOIZUMI et al. 2001, NAKAMURA et al. 2006, KALPRAVIDH et al. 2009). Der überwiegende Teil der Literatur, welcher sich mit der Verwendung von AM zur Rekonstruktion der Hornhautoberfläche beschäftigt, gibt die oben beschriebene Konservierungsmethode an. Ein wichtiger Aspekt dabei ist die Erhaltung der biologischen Bestandteile sowie der Struktur der AM. Bei der Kryokonservierung in Glycerin bleiben diese nahezu vollständig erhalten (RODRÍGUEZ-ARES et al. 2009). Im Moment stellt sie also die am weitesten verbreitete Lagerungsmethode für Amnion dar. Allerdings ist zu bedenken, dass dafür eine Tiefkühleinrichtung nötig ist, die mindestens $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ konstant gewährleisten kann und in der Regel sehr kostenintensiv ist. Eine weitere Möglichkeit der Konservierung ist die Lyophilisierung (Gefriertrocknung) bei der dem Gewebe durch Sublimation Wasser entzogen wird. Dadurch kommt es zu einer Hemmung von gewebschädlichen chemischen Reaktionen, welche nur im wässrigen Milieu stattfinden können. Gefriergetrocknete Amnien können bei Raumtemperatur über einen langen Zeitraum ohne Verschlechterung der Qualität gelagert werden. Der Transport ist im Gegensatz zu kryokonserviertem Material unkomplizierter. Einige Studien beschreiben eine Kombination aus Lyophilisierung und γ -Bestrahlung zur Haltbarmachung der AM (NAKAMURA et al. 2004, BHATIA et al. 2007). Bei einer Verabreichung geeigneter Strahlendosen zeigt sich ein antibakterieller, antiviraler sowie antimykotischer Effekt. Allerdings können die biologischen Eigenschaften und das Gewebe negativ beeinflusst werden. Durch den Wasserentzug bei der Gefriertrocknung entstehen im Vergleich zur Kryokonservierung makroskopisch dünnere und weniger robuste Amnien. Auch mikroskopisch konnten RODRÍGUEZ-ARES et al. (2009) Unterschiede zwischen kryokonservierten und lyophili-

sierten Präparaten finden. So wiesen die kryokonservierten Amnien eine dickere Basalmembran auf und zeigten einen höheren Proteingehalt. Im Gegensatz dazu berichten NAKAMURA et al. (2004), dass es keinen Unterschied bezüglich der Reißfestigkeit zwischen kryokonservierten und gefriergetrockneten mit γ -Strahlung behandelten Amnionmembranen gab. Des Weiteren gab es laut den Autoren durch beide Konservierungsmethoden keine signifikanten Änderungen der Gewebestruktur sowie der Bestandteile der extrazellulären Matrix wie den Kollagenen Typ I, III, IV, V, VII, Fibronectin und Laminin. MEHTA et al. (2008) konnten jedoch eine Reduktion von zahlreichen Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel VEGF, PDGF-A und B, EGFR und TGF- β 2 Rezeptor in gefriergetrockneten mit γ -Strahlung behandelten AMs im Vergleich zu kryokonservierten AMs feststellen. Im Rahmen der klinischen Anwendung, zeigen sich auch bei der Verwendung lyophilisierter AM gute Resultate. So berichteten AHN et al. (2005), nach Kultivierung von kornealen Epithelzellen auf lyophilisierter und kryokonservierter AM, von vergleichbar erfolgreichen kornealen Rekonstruktionen bei Kaninchen. LIBERA et al. (2008) zeigten ebenfalls an einem Kaninchenmodell, dass die Epithelisierungsrate bei der Verwendung kryokonservierten im Vergleich zu lyophilisierten AMs zur Behandlung einer kornealen Perforation gleichermaßen schnell voran schreitet. Da es durch die Lyophilisierung zu einer Beeinträchtigung der strukturellen und biologischen Eigenschaften kommen kann, beschrieben NAKAMURA et al. (2008) den Einsatz von Trehalose zur Stabilisierung der Zellmembran sowie zum Schutz der Proteine der gefriergetrockneten AM. Die Autoren berichteten, dass durch die Behandlung der AM mit 10 % Trehalose vor der Gefrier Trocknung sowohl die Struktur als auch die biologischen Eigenschaften besser erhalten waren, als bei Membranen die ohne Trehalose gefriergetrocknet wurden. Sie konnten in den Trehalose vorbehandelten Membrane die Kollagene Typ I, III, IV, V und VII sowie Fibronectin und Laminin-5 nachweisen. Trehalose ist ein Disaccharid, welches natürlicherweise in Organismen anzutreffen ist, welche in der Lage sind eine nahezu vollständige Austrocknung zu überleben. Die Trehalose ist in der Lage einen Teil des intrazellulären Wassers zu ersetzen. Dies führt zum Schutz der Zellstruktur sowie der zellulären Proteine während der Lyophilisierung (CROWE et al. 2001). NAKAMURA et al. (2008) haben beispielsweise Trehalose behandelte AM erfolgreich zur Rekonstruktion von kornealen Oberflächen beim Kaninchen verwendet. Die Trehalose behandelten AM waren den nicht Trehalose behandelten AMs in den Punkten korneale Transparenz und Epithelisierung überlegen. Die Trehalose wird zudem auch für die Konservierung von Lungentransplantaten verwendet (CHEN et al. 2004). Eine weitere Konservierungsmöglichkeit ist die Behandlung mit Peroxyessigsäure (PAA). Hierbei handelt es sich um eine Substanz, die standardmäßig zur Sterilisation eingesetzt wird und durch ihre starke oxidative Wirkung sowohl bakterizide, antivirale als auch sporizide Eigenschaften in sich vereint (KLINKE und HULL 1960, BALDRY 1983). Nach Behandlung mit PAA konnte laut LIBERA et al. (2008) und VERSEN-HÖYNECK et al. (2004b) eine gut erhaltene Struktur der AM nachgewiesen werden. Nach den Autoren sind die Kollagene Typ I und III in den PAA behan-

delten AMs im Vergleich zu den mit γ -Strahlung behandelten AMs reichlich vorhanden. Auch Kollagen Typ IV, Fibronectin und Laminin als Bausteine der Basalmembran blieben bei der Sterilisation mit PAA erhalten. WILSHAW et al. (2006) konnten zeigen, dass es durch die PAA-Behandlung der AM zu keinem signifikanten Verlust der Elastizität und der Reißfestigkeit kommt. VERSEN-HÖYNCK et al. (2004a) untersuchten in einer klinischen Studie die Verwendung von PAA behandelten, luftgetrockneten AMs zur Behandlung von kornealen Erkrankungen, vor allem Ulzerationen. Nach Aussage der Autoren behält die AM auch nach dem Konservierungsprozess ihre biologischen Eigenschaften, ist also weiterhin flexibel und legt sich dank ihres adhäsiven Charakters gut der Korneaoberfläche an. Außerdem kann sie unproblematisch bei Raumtemperatur gelagert und transportiert werden. Allerdings sind laut den Autoren auch viele aufwendige Einzelschritte (Präparation, Sterilisation, Konservierung) nötig um ein biologisch sicheres Produkt in hoher Qualität zu erhalten, dass für eine Transplantation geeignet ist.

3 Material und Methoden

3.1 Gewinnung und Präparation der kaninen Amnionmembran

3.1.1 Gewinnung der Fruchthüllen

Die Plazentae und die dazu gehörigen Fruchthüllen für die Untersuchungen wurden im Zeitraum März 2014 bis Mai 2018 entnommen. Die Plazentae sowie das Allantoamnion wurden ausnahmslos im Rahmen eines Kaiserschnittes (Sectio caesarea) unter sterilen Kautelen entnommen. Das Einverständnis der Tierbesitzer für die Entnahme des Probenmaterials wurde nicht eingeholt, da der Vorgang zu keiner Zeitverzögerung der Operation führt und damit kein erhöhtes Risiko für die Vitalität der Welpen darstellt. Zudem werden die Plazentae und die Fruchthüllen aus hygienischen Gründen für gewöhnlich der Entsorgung zugeführt und nicht dem Besitzer ausgehändigt.

Als Indikation lag bei allen Eingriffen eine Geburtsstockung zugrunde. Der Verlauf der Operation wurde durch die Entnahme des Untersuchungsmaterials zu keiner Zeit gestört. Die Hündinnen wurden hierfür mit Propofol (Narcofol®, cp-pharma, Burgdorf, Deutschland) intravenös nach Wirkung in Vollnarkose versetzt. Diese wurde mit 2 % Isofluran (Isofluran CP®, cp-pharma, Burgdorf, Deutschland) weiter aufrechterhalten. Die Tiere wurden dabei mit einer Atemfrequenz von 10 Atemzügen pro Minute sowie mit einem Atemzugvolumen von 10 ml/kg Körpergewicht dauerhaft beatmet. Die Überwachung während der kompletten Anästhesiezeit erfolgte bei allen Patienten mittels CO₂- Messung, EKG und Pulsoxymetrie. Als erweiterte Analgesie erhielten 9 der 14 Hündinnen eine epidurale Anästhesie mit Mepivacain 2 % (Scandicain® 2 %, Astra Zeneca GmbH, Wedel, Deutschland). Die 5 Kaiserschnitte, bei denen keine epidurale Anästhesie zum Einsatz kam, wurden in der Tierklinik Panitzsch beziehungsweise in der Tierarztpraxis Dr. Krügel in Westdorf durchgeführt, während die Tiere mit einer extraduralen Anästhesie in der Kleintierklinik der Universität Leipzig operiert wurden.

Nach erfolgter Intubation wurden die Hündinnen auf die Operation vorbereitet indem die ventrale Bauchwand zwischen Sternum und Os pubis in kranio-kaudaler Ausdehnung und bis jeweils lateral beider Milchleisten geschoren wurden. Die Hündinnen wurden dann in Rückenlage gelagert, die Haut im Operationsbereich mit Waschbenzin gereinigt und mit dreimaliger Anwendung eines Hautdesinfektionsmittels (Sterilium®, BODE Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland) desinfiziert. Nach steriler Abdeckung der Hündin mit einem Abdecktuch (Foliodrape®, Hartmann, Heidenheim, Deutschland) wurde das Abdomen circa einen Zentimeter kranial des Nabel, und bis kurz vor das Os pubis ventro-median in der Linea alba eröffnet.

Über die vorhandene Öffnung der Bauchdecke wurde der Uterus aus der Bauchhöhle heraus verlagert und durch eine sterile wasserundurchlässige Folie (Buster®, Henry Schein, Melville, USA) vom restlichen Abdomen getrennt um eine Kontamination bei Eröffnung des Organs zu vermeiden. Die Entwicklung der Welpen erfolgte über eine Schnittinzision der Gebärmutter im Bereich des Uteruskörpers und/oder an einem oder beiden Uterushörnern. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich die Früchte in einem intakten Allantoamnion befanden. Zur Unterbindung der placentaren/fetalen Verbindung wurde die Nabelschnur mit einer Arterienklemme versehen. Darauf folgend wurde die Plazenta aus dem Uterus heraus massiert und hinter der Klemme abgesetzt. Der nächste Schritt stellte die Eröffnung der Fruchthüllen sowie die Abnabelung des Welpen dar. Hierfür wurden zwei weitere Mosquitoklemmen verwendet, die die Nabelschnur unmittelbar hinter dem Welpen unterbanden. Zwischen diesen beiden Klemmen wurde die Nabelschnur schließlich durchtrennt. Das Allantoamnion wurde unverzüglich der weiteren Präparation zugeführt.

3.1.2 Ein-und Ausschlusskriterien

In die Studie gingen nur Amnien aus Kaiserschnitten mit eindeutiger medizinischer Indikation ein. Dazu zählten eine Plazentaablösung vor der Geburt des ersten Welpen, ultrasonographisch lebensschwache Welpen sowie radiologisch ein oder mehrere absolut oder relativ zu große Welpen. Es wurden also keine Amnien aus geplanten Kaiserschnitten verwendet. Zeigten die Fruchthüllen bei der Adspektion Anzeichen für eine frühzeitige Ruptur und/oder einer Infektion, so wurden sie von der Untersuchung ausgeschlossen. Des Weiteren führten bereits tote und auch fehlgebildete Welpen zu einem Ausschluss der zugehörigen Amnien.

3.1.3 Isolierung der Amnionmembran

Die Präparation erfolgte in einem Operationssaal unter aseptischen Bedingungen. Der Arbeitsplatz wurde mit einem sterilen Abdecktuch (Foliodrape®, Hartmann, Heidenheim, Deutschland) abgedeckt. Zunächst wurde das Allantoamnion in zwei Nierenschalen, welche mit steriler 0,9 prozentiger Kochsalzlösung gefüllt waren, gewaschen um es von Blutbestandteilen und Nachgeburtsresten zu reinigen.

Die Trennung der Amnionmembran von der Allantois erfolgte auf einem feuchten, sterilen Bauchtuch. Hierbei wurde die AM teils mit der Hand und teilweise mit Hilfe von angefeuchteten Wattetupfern stumpf von der Allantois getrennt. Während der Isolierung wurde streng auf eine andauernde Feuchterhaltung des gesamten Allantoamnions geachtet. Im nächsten Schritt wurde die AM händisch mit der epithelialen Seite nach oben auf einen sterilen Membranfilter aus Nitrocellulose (Whatman®, Merck, Darmstadt, Deutschland) gespannt und auf diesem mit Hilfe eines Seidenfadens (Perma-Handseide® 4-0, Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) oder eines monophilen

Fadens (Monocryl® 5-0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) fixiert. Dabei wurde auf einen überstehenden Saum von ca. 0,5 cm geachtet. Die Membranfilter mit aufliegender AM wurden bis zur Überführung in die Konservierungslösung zur kurzzeitigen Zwischenlagerung in Kochsalzlösung 0,9 % verbracht.

3.2 Kryokonservierung der kaninen Amnionmembran

3.2.1 Herstellung der Kryokonservierungslösung

Für die Herstellung der Kryokonservierungslösung wurden 85 prozentiges Glycerin, ein Nährmedium für Zellkulturen (Dulbecco`s Modified Eagle Medium) sowie die Antibiotika Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml und 10 mg/ml) und Amphotericin B (250 mg/ml) verwendet.

Die aseptische Abfüllung der genannten Komponenten erfolgte in der Arkana Apotheke OHG in Leipzig. Alle eingesetzten Ausgangsstoffe und Materialien wurden in ihren Originalbehältnissen unter Außendesinfektion in eine Laminar Air Flow-Werkbank (= LAF TYP BM Pro 130, Fa. Berner) eingebracht. Die Herstellung und das Abfüllen aller Lösungsbestandteile erfolgten unter ausschließlicher Nutzung steriler Hilfsmittel. Der Lösungsmenge von 500 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) wurden jeweils 10 ml (Einwegspritze, Fa. Becton Dickinson) Amphotericin-Lösung sowie 10 ml Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Aus dieser Mischung wurden mithilfe einer 35 ml Spritze (Fa. Codan) jeweils 20 x 25 ml in 50 ml Röhrchen abgefüllt und diese mit einem Schraubdeckel verschlossen. Aus 1000 ml Glycerin 85 % wurden mithilfe einer 50 ml Spritze jeweils 20 x 50 ml in 50 ml Röhrchen abgefüllt und diese verschlossen.

Die DMEM- Lösung wurde bis zu ihrem Gebrauch bei -20 °C gelagert und unmittelbar vor Gebrauch bei Raumtemperatur erwärmt. Das Glycerin wurde bei +5 °C im Kühlschrank gelagert.

3.2.2 Durchführung der Kryokonservierung und Lagerung der Proben

Die Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung für die Konservierung einer Amnionprobe erfolgte stets im Zuge der Vorbereitungen auf die Operation. Hierzu wurde die DMEM-Lösung zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend mit der Glycerin-Lösung unter aseptischen Bedingungen in einem Verhältnis von 1:1 miteinander gemischt. Jeweils 2,5 ml DMEM/Pen/Strep/Amphotericin B und 2,5 ml Glycerin wurden in einem Probenröhrchen zusammengefügt. Auf diese Weise wurden je drei Probenröhrchen pro Amnion präpariert. Die während der Operation gewonnene Amnionprobe wurde wie oben beschrieben auf einen Membranfilter (Whatman®, GE Healthcare, Chalfont, UK) gespannt. Letzterer wurde, wie in Abbildung 6 gezeigt, in vier gleichgroße Teile geschnitten. Drei der vier entstandenen Teile wurden so auf die Probenröhrchen verteilt, dass die AM möglichst

nicht die Wand des Röhrchens berührt. Die Konservierung erfolgte in dem oben beschriebenen Medium bei - 80 °C.

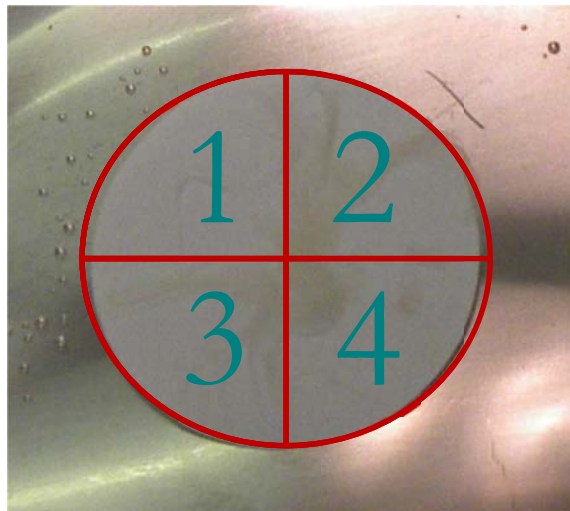


Abbildung 6: Nitrozellulose-Membranfilter mit aufliegender kaniner Amnionmembran inklusive schematischer Darstellung der Aufteilung in vier gleich große Proben. Jede Probe steht für einen Untersuchungszeitpunkt.

3.2.3 Definition der Untersuchungszeitpunkte

Die oben beschriebene Aufteilung der Amnionprobe diente der jeweiligen Qualitätskontrolle ein und desselben Substrates nach unterschiedlichen Lagerungszeiträumen. Die Proben 0 wurde am Tag der Entnahme (Tag 0) sowohl der histologischen als auch der mikrobiologischen Untersuchung zugeführt. Die Proben an Tag 1 wurden jeweils für 24 Stunden kryokonserviert und dann analysiert. An ihnen wurden vor allem die Einflüsse der kurzfristigen Einwirkung der Konservierungslösung sowie die des Einfrierprozesses selbst untersucht. Die Proben an Tag 90 (entspricht Anzahl der Lagerungstage) und 180 repräsentierten den möglichen Einfluss der Langzeitkonservierung auf die Amnionmembran.

Eine Langzeitkonservierung ist aus mehreren Gründen notwendig und sinnvoll. Zum einen müssen in der Humanmedizin vor der Anwendung der AM am Patienten serologische und mikrobiologische Untersuchungen des Spenders sowie des Transplantates selbst durchgeführt werden um die Sicherheit der AM zu garantieren, zum anderen führen mögliche Lagerungszeiten von 6 Monaten bis zu zwei Jahren zu einer verbesserten Verfügbarkeit der AM (HAHN et al. 2010, THOMASEN et al. 2011, JIRSOVA und JONES 2017). Da in der Veterinärmedizin noch keine festen Angaben über die maximal mögliche Lagerungszeit der AM existiert, orientieren sich die gewählten Zeitpunkte der Untersuchung für die kanine Amnionmembran an den in der Humanmedizin üblichen. Diese wiederum sind wie oben beschrieben durch die Überprüfung der biologischen Sicherheit determiniert (ADDS et al. 2001, QURESHI et al. 2010, THOMASEN et al. 2011).

3.3 Histologische Probenaufarbeitung

3.3.1 Paraffineinbettung und Schnittpräparation

Zur weiteren Verarbeitung wurden die Amnionproben nach Ablauf ihres Lagerungszeitraumes (Tag 1, 90, 180) beziehungsweise frisch (Tag 0) für mindestens 24-72 Stunden in 4 %iger Formaldehydlösung bei 5 °C fixiert um dann mit Hilfe eines automatisierten Verfahrens mit einem Hypercenter (Fa. Shandon, Frankfurt, Deutschland) in Paraffin (Paraplast R, Fa. Vogel, Gießen, Deutschland) eingebettet zu werden. Danach erfolgte das Ausbetten sowie das Schneiden von 4 µm dicken Schnitten an einem Schlittenmikrotom (Fa. Reichert-Jung, Wien, Österreich). Die angefertigten Schnitte wurden auf Objektträger (Superfrost Plus®, Menzel, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen.

3.3.2 Histologische Auswertung

Die Auswertung der Proben erfolgte durch lichtmikroskopische Untersuchungen an einem Standardmikroskop (BH-2, Fa. Olympus, Hamburg, Deutschland) des Institutes für Pathologie sowie an einem Standardmikroskop (Olympus BX-51, Hamburg, Deutschland) des Veterinär-Anatomischen Institutes der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig. Für die Analysen kamen das 40x und das 100x Objektiv zur Anwendung. Die Untersuchungen mit dem 100x Objektiv fanden unter Verwendung von Immersionsöl (Immersol®, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland sowie Immersionsöl, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) statt.

3.3.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)

Die H.E-Färbung, als Routinefärbung in der Histologie, diente in der vorliegenden Arbeit der Orientierung. Zur Beurteilung der morphologischen und morphometrischen Charakteristika der kaninen Amnionmembran sowie deren Erhalt über die Zeit der Kryokonservierung erwies sich allerdings die PAS-Reaktion als besser geeignet.

3.3.2.2 Periodic Acid Schiff Reaktion (PAS-Reaktion)

Es wurde die PAS-Reaktion nach McManus (ROMEIS et al. 2010) verwendet. Hier kommt es durch die Perjodsäure als Oxidationsmittel zur Oxidation von Glycolgruppen zu Aldehydgruppen. Durch die Bindung des Schiffchen Reagenz an diese Aldehydgruppen entsteht ein magentaroter bis violetter Farbkomplex. Damit werden Makromoleküle wie zum Beispiel Glykoproteine, Glykogen, Glykolipide und Mukopolysachharide nachgewiesen.

Die Schnitte wurden zu diesem Zweck zunächst mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und folgend für 10 Minuten mit Perjodsäure 1 % behandelt. Nach einem Spülvorgang mit destilliertem Wasser folgte die Inkubation mit der Schiffreagenz für 45 Minuten. Danach wurden die Schnitte 20 Minuten fließend gewässert. Als weitere Schritte folgten das Färben mit Hämalaun für 5 Minuten sowie das Bläuen für weitere 10

Minuten. Der nächste Schritt beinhaltete das Entwässern der Schnitte mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol. Im letzten Schritt wurden die Schnitte mit Hilfe eines Eindeckautomaten (Tissue tec®, Fa. Sakura, Staufen, Deutschland) mit einem Folienband eingedeckt, welches mit einem Xylol löslichen Klebstoff beschichtet ist.

Das Ziel der PAS-Reaktion war die Darstellung der Basalmembran (BM) der Amnionmembran. Diese ist reich an Glykoproteinen wie zum Beispiel Laminin und Fibronectin und lässt sich daher gut durch diese Färbemethode darstellen. Hier zeigte sich allerdings in den meisten Schnitten ein wenig zufriedenstellendes Ergebnis. Die PAS-Reaktion wurde in dieser Studie also nur zur Messung der Gesamtdicke sowie zur morphologischen Untersuchung des Gewbeerhalts der AM über die Zeit der Kryokonservierung verwendet.

Zur Beurteilung der Dicke wurden die Proben der Tage 0, 1, 90 und 180 jeder Amnionmembran an 5 repräsentativen Stellen bei 400facher Vergrößerung mit Hilfe des Programms cellSens Dimension von Olympus ausgemessen. Für die Messung wurde darauf geachtet, dass die AM möglichst ohne Aufwerfungen flach auf dem Trägermaterial auflag und alle Schichten dort möglichst gut erhalten waren. In Abbildung 7 ist die Messung der Dicke der AM exemplarisch dargestellt. Die so akquirierten Daten wurden in ein Datenverarbeitungsprogramm (Excel®, Microsoft office) exportiert. Dort wurde aus diesen Werten der Median sowie der Mittelwert der Tage 0, 1, 90 und 180 gebildet.

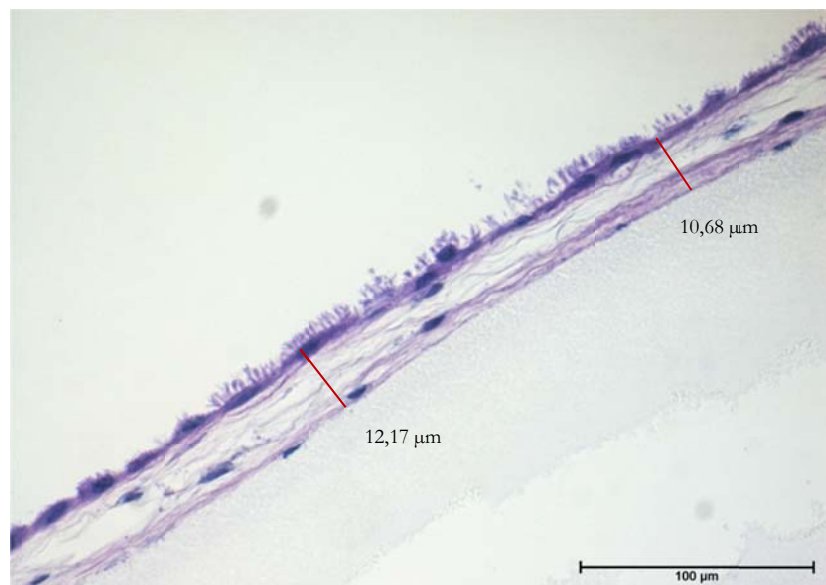


Abbildung 7: Kanine Amnionmembran an Tag 1 der Kryopräservierung, Dickenmessung in μm an zwei Stellen im Präparat, PAS-Reaktion, 400fache Vergrößerung

Bei der morphologischen Untersuchung wurden folgende Kriterien berücksichtigt. Zum einen wurde der Zustand der Zellen des Epithels, zum anderen die Erhaltung des Mikrovillisaums auf den Epithelzellen sowie die des extrazellulären Stromas beurteilt. Daraus ergibt sich die Bewertung von drei Komponenten. Die morphologische Beurteilung der AM fand ebenfalls an einer repräsentativen Stelle des Präparates über eine Strecke von 2000 μm statt. Bei der Bewertung des Epithels wurde eine Modifikation des Scores nach

(CHIU 1970) angewendet. Als Degenerationszeichen der Epithelzellen wurden Pyknose, Karyolyse sowie eine Zellyse angesehen. Weiterhin wurden Unterbrechungen des Zellverbandes sowie die Ablösung der Epithelzellen von der Basalmembran beziehungsweise des Stromas als Anzeichen eines Zelluntergangs gewertet. Um den Anteil von degenerierten Epithelzellen auf der Strecke von 2000 μm zu ermitteln, wurde die Gesamtzahl der Epithelzellen sowie die Anzahl der Epithelzellen mit Degenerationsanzeichen ausgezählt und je nach prozentualem Ergebnis ein Score von 0-5 vergeben.

Die Beurteilung des Stromas sowie des Mikrovillisaums erfolgte wie in Tabelle 1 abgebildet ebenfalls durch einen Score von 0-5 beziehungsweise 0-4. Bei der Bewertung des Stromas wurden 13,3 Gesichtsfelder a 150 μm in der 1000fachen Vergrößerung auf eine Spaltraumbildung hin beurteilt. Der Zustand des Mikrovillisaums wurde subjektiv bei einer 400fachen Vergrößerung bewertet. In den Abbildungen 8, 9 und 10 ist jeweils ein Beispiel für die sechs bzw. fünf möglichen Grade der drei morphologischen Merkmale (Epithelmorphologie, Stromabeschaffenheit, Erhalt des Mikrovillisaums) dargestellt. Bei der Untersuchung der Epithelmorphologie kamen Grad 0 und 1 nicht vor, sodass für diese keine Beispielbilder existieren.

Tabelle 1: Morphologische Untersuchung der Amnionmembran anhand der PAS-Reaktion

Graduierung	Erhalt des Mikrovillisaums	Epithelmorphologie Score angepasst an Chiu et al. (1970)	Stromabeschaffenheit
0	vollständig erhalten	Epithel vollständig intakt	Stroma vollständig intakt
1	gut erhalten	einzelne Epithelzellen sind von der Basalmembran/ dem Stroma gelöst oder zeigen Anzeichen einer Degeneration	Stroma zeigt an einzelnen Stellen Spaltenbildung
2	mäßig erhalten	deutlich weniger als die Hälfte der Epithelzellen haben den Kontakt zur BM/dem Stroma verloren oder zeigen Anzeichen einer Degeneration	Stroma zeigt an weniger als der Hälfte eine Spaltenbildung
3	schlecht erhalten	die Hälfte der Epithelzellen haben den Kontakt zur BM/dem Stroma verloren oder zeigen Anzeichen einer Degeneration	Stroma zeigt an der Hälfte eine Spaltenbildung
4	nicht erhalten	deutlich mehr als die Hälfte der Epithelzellen haben den Kontakt zur BM/dem Stroma verloren oder zeigen Anzeichen einer Degeneration	Stroma zeigt über der Hälfte eine Spaltenbildung
5		vollständiges Ablösen der Epithelzellen von der BM/dem Stroma und/oder alle Epithelzellen zeigen eine ausgeprägte Degeneration	nahezu kein Stroma mehr vorhanden

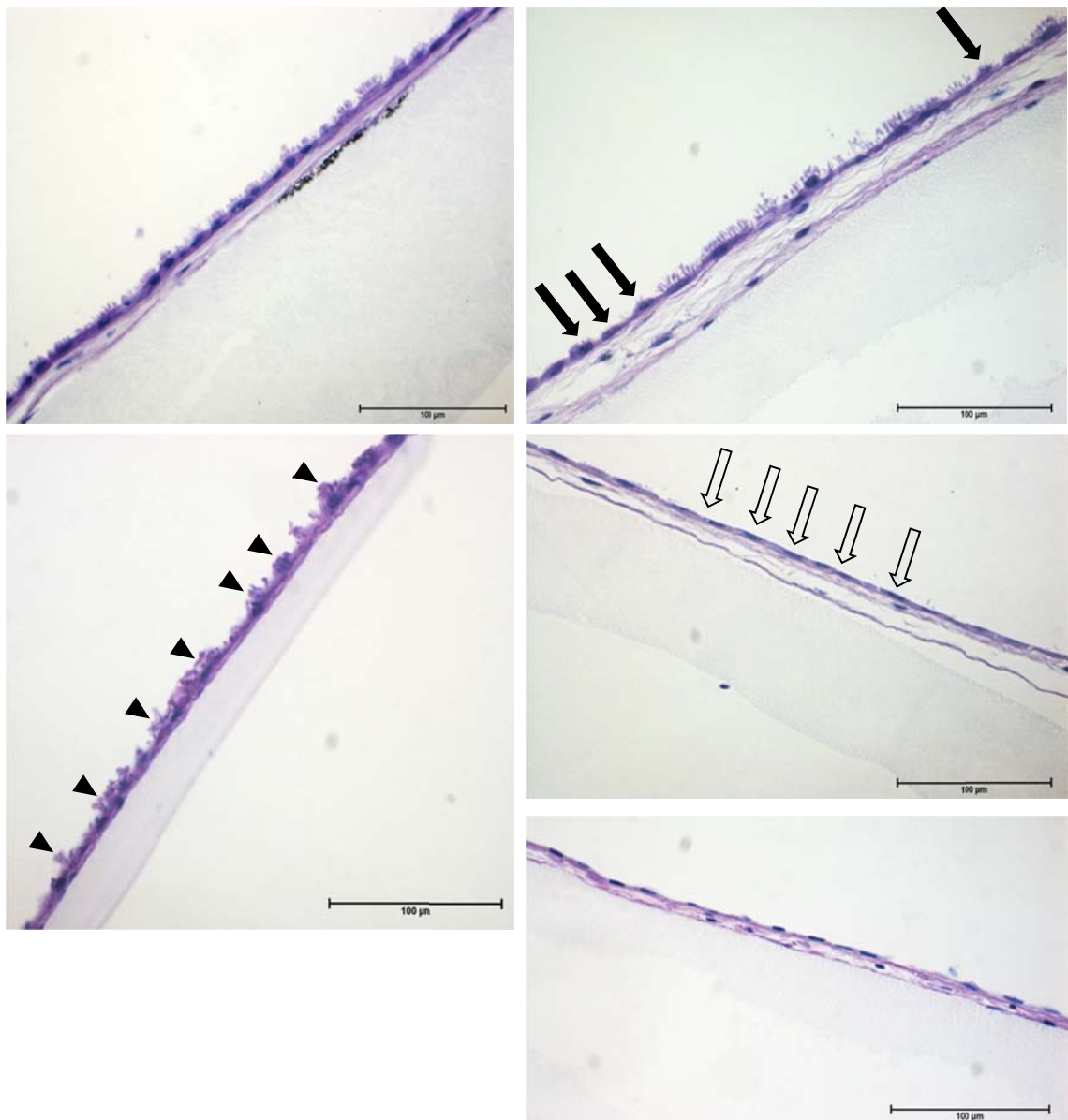


Abbildung 8: Erhalt des Mikrovillisaums

Grad 0 (oben links) vollständig erhalten, Grad 1 (oben rechts) einzelne Epithelzellen tragen kürzere Mikrovilli (Pfeile), Grad 2 (Mitte links) mehrere Epithelzellen tragen kurze und plumpe Mikrovilli (Pfeilspitzen), Grad 3 (Mitte rechts) fehlender Mikrovillisaum auf den meisten Epithelzellen (offene Pfeile), Grad 4 (unten rechts) Mikrovillisaum fehlt vollständig, PAS-Reaktion, 400fache Vergrößerung

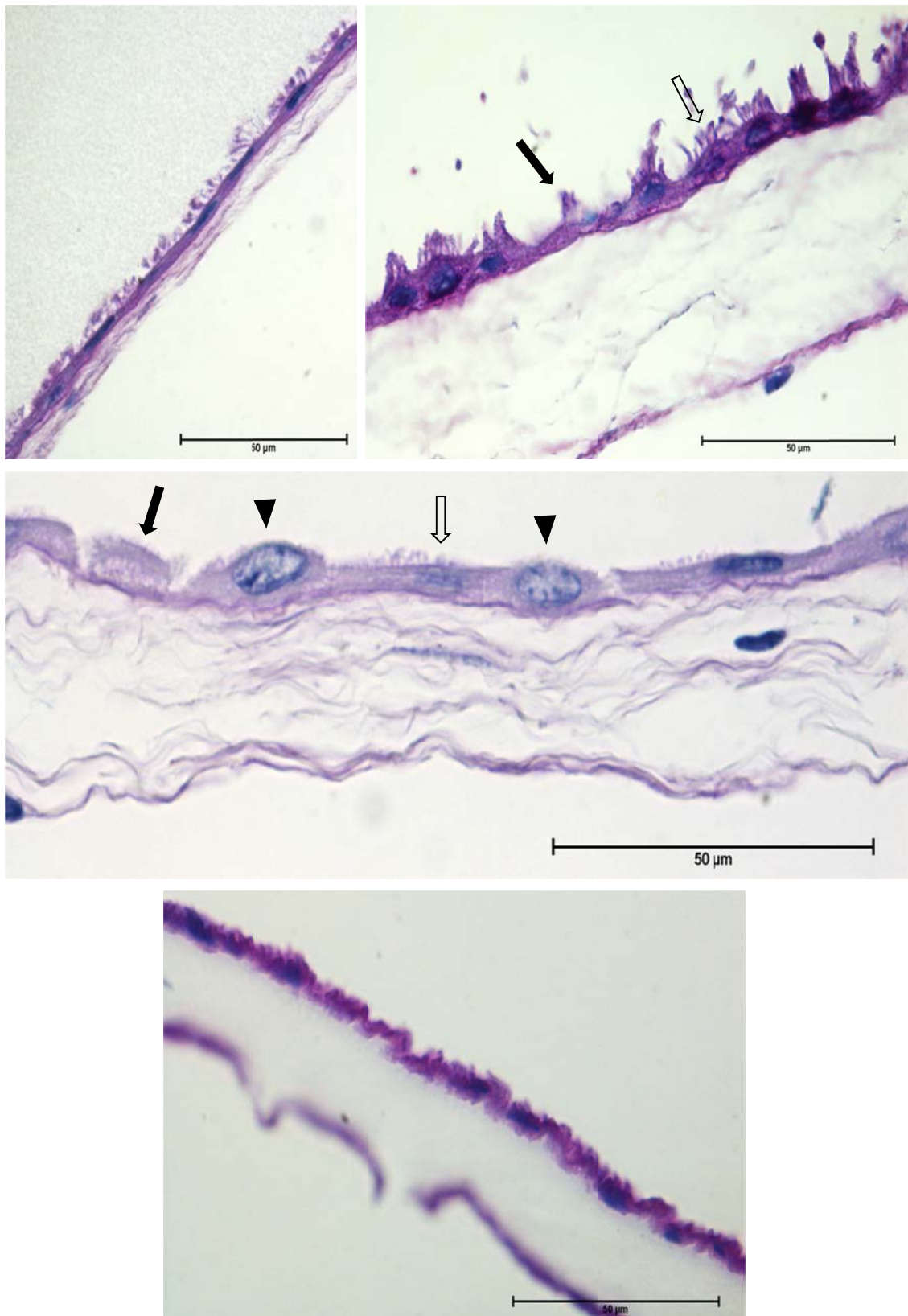


Abbildung 9: Epithelmorphologie

Grad 2 (oben links), Grad 3 (oben rechts) Zellyse und Pyknose, Grad 4 (mittig) Zellyse, Pyknose und Karyolyse, Grad 5 (unten) Verlust der Zellgrenzen, alle Zellkerne mit kondensiertem Chromatin; Anzeichen einer Epithelzelldegeneration: Zellyse (Pfeile), Pyknose (offene Pfeile), Karyolyse (Pfeilspitzen), PAS-Reaktion, 1000fache Vergrößerung

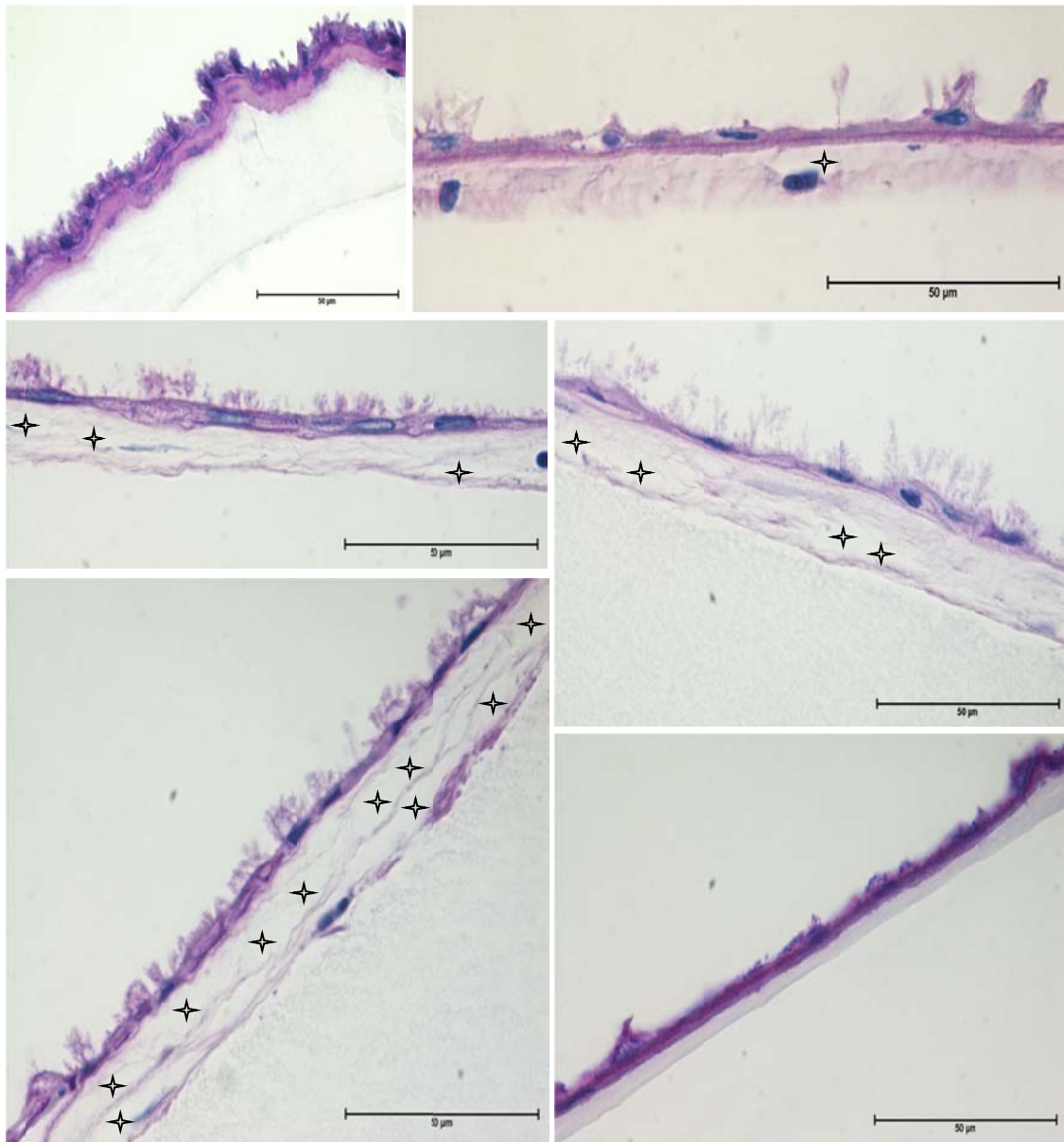


Abbildung 10: Stromabeschaffenheit

Grad 0 (oben links), Grad 1 (oben rechts), Grad 2 (Mitte links), Grad 3 (Mitte rechts), Grad 4 (unten links), Grad 5 (unten rechts) nahezu kein Stroma mehr vorhanden; Spaltenbildung (Sterne), PAS-Reaktion, 1000fache Vergrößerung

3.3.2.3 Immunhistologische Färbung

Die Grundlage der immunhistologischen Untersuchung ist die Antigen-Antikörperreaktion, bei welcher der Antikörper an ein spezifisches Epitop des Antigens bindet. Man nutzt hier die Spezifität von Antikörpern, um ein oder mehrere Antigene am histologischen Schnitt, in Zellkulturen, im Blut oder Liquor sichtbar zu machen. Es können sowohl polyklonale Antikörper, welche an mehrere Epitope des Antigens binden können, als auch monoklonale Antikörper, die ausschließlich an ein Epitop binden, verwendet werden. In der Immunhistochemie unterscheidet man die direkte von der indirekten Methode.

Während bei der direkten Methode nur ein primärer Antikörper zum Einsatz kommt, der bereits mit einem färbenden Substrat gekoppelt ist, folgt bei der indirekten Methode dem unkonjugierten Primärantikörper ein sekundärer Antikörper, welcher an die Fc-region (stabile Region) des Primärantikörpers bindet. In diesem Fall ist erst der Sekundärantikörper mit einem Farbkomplex oder einem farbauslösenden Enzym gekoppelt. Bei dieser Methode können mehrere sekundäre Antikörper an einen Primärantikörper binden. Aufgrund der daraus resultierenden Steigerung der Signalintensität, findet die indirekte Methode deutlich häufiger Verwendung als die direkte Methode.

Auch im Rahmen dieser Untersuchungen kam die indirekte Methode zur Anwendung. Für die Markierung des Zielproteins Laminin, kam ein polyklonaler Kaninchen anti-Laminin-Antikörper zum Einsatz. Als Detektionssystem wurde EnVision® (DAKO, Hamburg, Deutschland) verwendet. Hierbei handelt es sich, wie in Abbildung 11 dargestellt, um ein Polymer, welches sich aus einer großen Anzahl Sekundärantikörper, die an ein Dextrangerüst gebunden sind, zusammensetzt. Das Dextrangerüst enthält zusätzlich das Enzym Meerrettich-Peroxidase. Dieses reagiert mit DAB (3,3'-Diaminobenzidin) zu einem braunen, in Wasser unlöslichen Endprodukt und macht so die Antigen-Antikörperreaktion sichtbar.

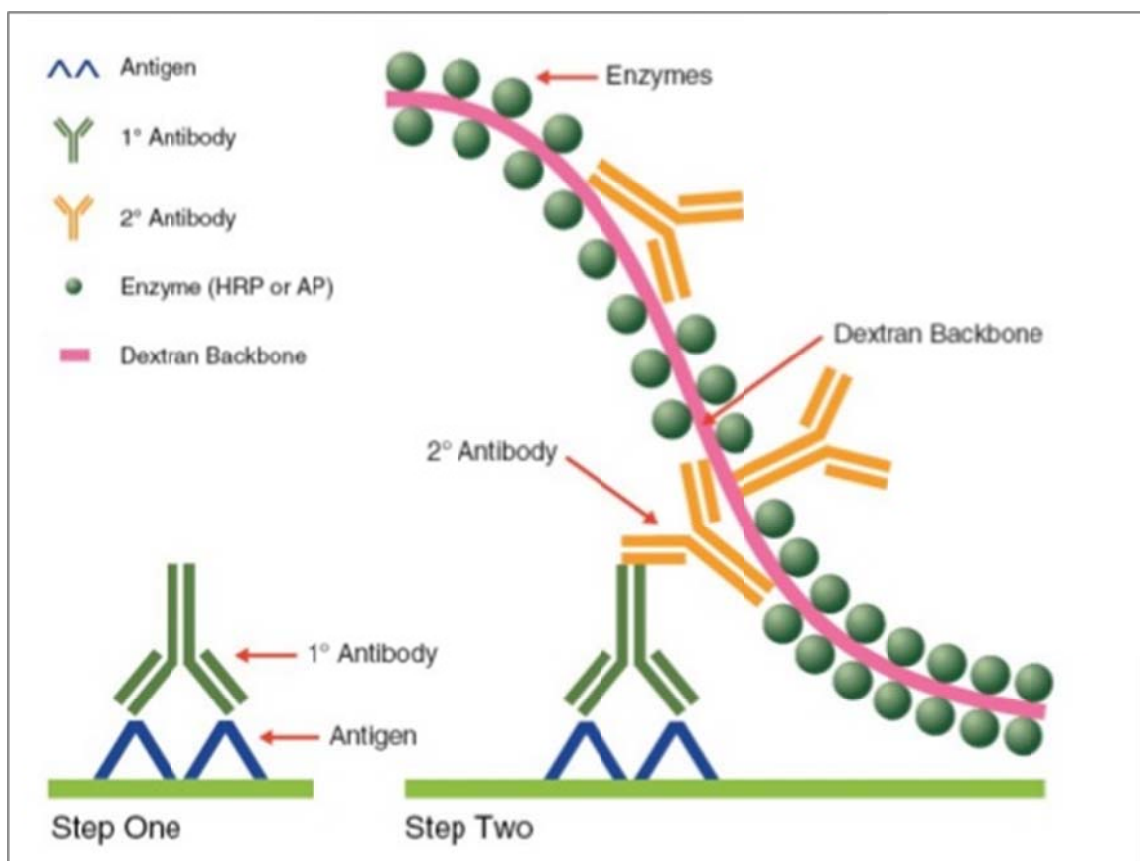


Abbildung 11: Schematische Darstellung des EnVision-Systems zur Detektion von Antigenen mit Hilfe der indirekten immunhistochemischen Methode

Quelle: <https://www.slideshare.net/Leica-Microsystems/sren-nielsen-ihc-pitfalls-leica-2011>

Für die immunhistologische Untersuchung wurden die Schnitte mit Xylol, Isopropanol und Alkohol 96 % entparaffiniert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der endogenen Peroxidase mit Wasserstoffperoxid 3 % in Methanol. Es folgte eine Spülung in TBS (Trisgepufferte Kochsalzlösung). Als nächster Schritt schloss sich ein 15 minütiges Wasserbad bei 95 °C zur Minimierung der Hintergrundfärbung an. Nach einer Abkühlzeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Schnitte einer Proteasebehandlung zur Antigen-demaskierung unterzogen. Nachdem ein weiterer Spülvorgang mit TBS durchgeführt wurde, erfolgte das Blocken von unspezifischen Proteinbindungsstellen mit 5 % Ziegenserum in TBS für 30 Minuten. Danach schloss sich die Inkubation mit dem polyklonalen Primärantikörper (Kaninchen-Anti-Laminin, Sigma®, Darmstadt, Deutschland) in einer Verdünnung 1:750 in TBS über Nacht bei 4 °C an. Nach einem weiteren Spülgang mit TBS wurden die Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem EnVision®-Detektionssystem inkubiert, nochmals mit TBS gespült und dann für 10 Minuten mit DAB versetzt. Nach einem weiteren Spülvorgang mit TBS erfolgte die Gegenfärbung mit Papanicolaou für 10 Sekunden. Anschließend folgte die Entwässerung der Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol. Der letzte Schritt beinhaltete das Eindecken der Schnitte mit Hilfe eines Eindeckautomaten (Tissue Tec®, Fa. Sakura, Staufen, Deutschland) mit einem Folienband, welches mit einem Xylol löslichem Klebstoff beschichtet ist.

Für alle Proben wurde jeweils eine Negativ- sowie eine Positivkontrolle mitgeführt. Im Rahmen der Negativkontrolle wurden die Schnitte anstatt mit dem Primärantikörper mit Kaninchennormalserum inkubiert. Für die Positivkontrolle wurde äußere Haut verwendet und diese mit dem Primärantikörper inkubiert. Das Protokoll befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

Die immunhistologische Untersuchung diente dem Nachweis von Laminin, einem Glykoprotein und quantitativ dominierendem Bestandteil der Basalmembran. Um diese zu beurteilen, wurde ein 2000 µm langer Abschnitt jedes Schnittes bei 1000facher Vergrößerung untersucht. Zur Beurteilung der BM wurden zwei Kriterien herangezogen. Zum einen wurde ihre Abgrenzbarkeit zu den umliegenden Strukturen wie dem Epithel und dem Stroma beurteilt. Diese konnte mit gut = 3, mäßig = 2 oder schlecht = 1 sowie nicht abgrenzbar = 0 beurteilt werden. Zum anderen wurde die Kontinuität der BM über den oben genannten Abschnitt untersucht. Die Amnionmembran sollte innerhalb dieser Zone möglichst auf dem Trägermaterial aufliegen und wenn möglich alle Schichten aufweisen. Hierbei wurde auf Unterbrechungen der braunen Immunreaktionslinie der BM, welche in Abbildung 13 oben links im Bild lückenlos zu sehen ist, geachtet und diese innerhalb der genannten 2000 µm ausgezählt. Der genannte Messbereich wurde nochmals in 13,3 Gesichtsfelder a 150 µm aufgeteilt. Konnte auf einer dieser Strecken eine Unterbrechung der BM festgestellt werden, die sich bis zur nächsten Strecke fortsetzte, so wurde diese wie zwei Unterbrechungen gezählt, um der Länge des Kontinuitätsverlustes Rechnung zu tragen.

Daraus ergeben sich die in Tabelle 2 und 3 dargestellten Untersuchungsschemata, durch die sowohl die Abgrenzbarkeit der BM als auch die Anzahl der Unterbrechungen mit Hilfe eines Scores von 3-0 beziehungsweise 0-4 dargestellt werden können. Beispiele für die einzelnen Scores dieser Merkmale sind in Abbildung 12 und 13 bildlich dargestellt.

Tabelle 2: Beurteilung der Abgrenzbarkeit der Basalmembran (BM), 1000fache Vergrößerung

3	gut
2	mäßig
1	schlecht
0	nicht abgrenzbar

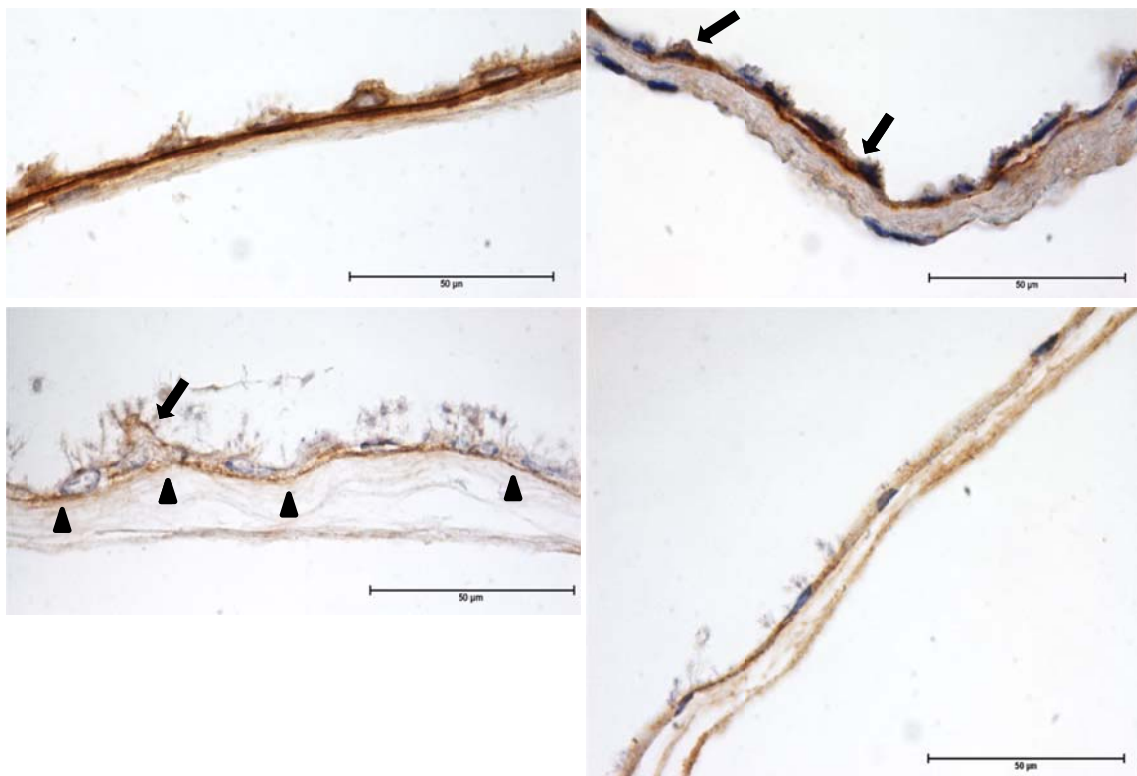


Abbildung 12: Abgrenzbarkeit der Basalmembran, Grad 3 (oben links) sehr deutliche durchgängige Immunreaktionslinie unterhalb der Epithelzellen, Grad 2 (oben rechts) Chromogen teilweise auch in den Epithelzellen (Pfeile), Grad 1 (unten links) Basalmembran nur leicht zu sehen (Pfeilspitzen), Chromogen auch in den Epithelzellen (Pfeil), Grad 0 (unten rechts) Basalmembran nicht abgrenzbar, immunhistochemische Färbung, Laminin, 1000fache Vergrößerung

Tabelle 3: Beurteilung der Unterbrechungen der Basalmembran (BM), 1000fache Vergrößerung

0	0-4
1	5-9
2	10-14
3	15-19
4	≥ 20

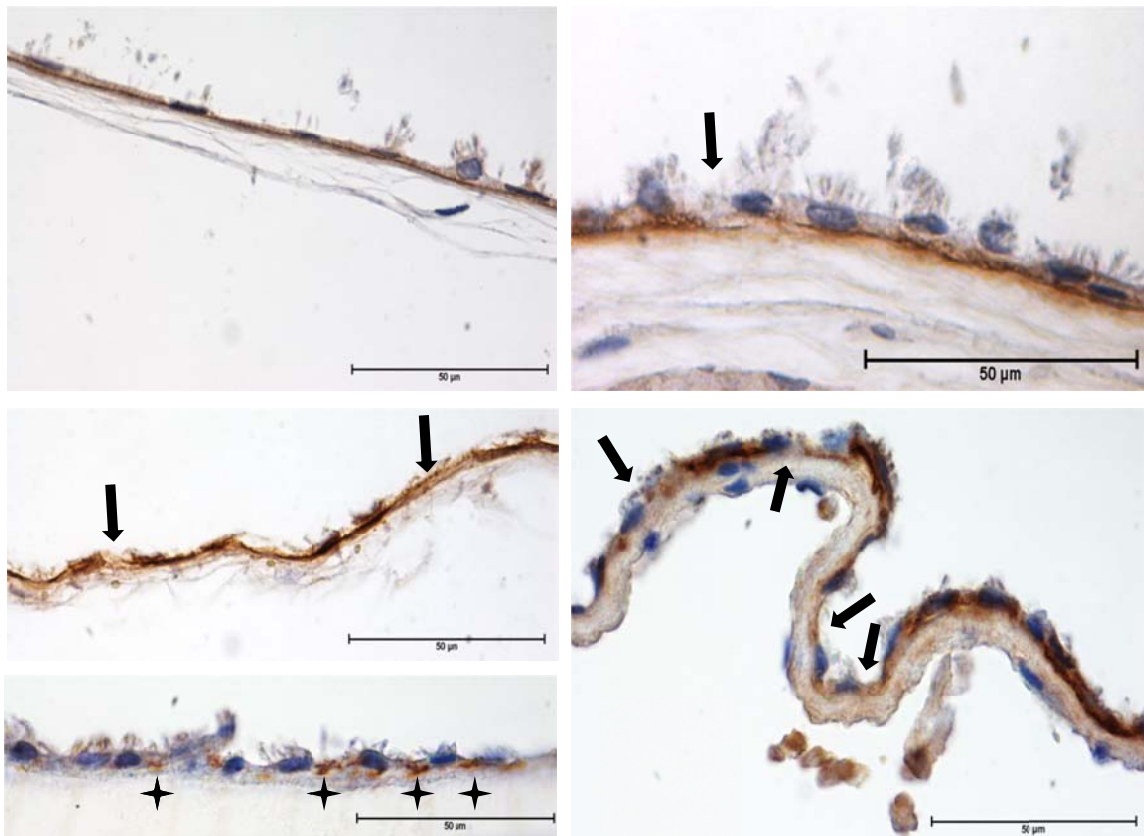


Abbildung 13: Unterbrechungen der Basalmembran auf einer Strecke von 2000 µm, Grad 0 (oben links) Basalmembran kontinuierlich, Grad 1 (oben rechts), Grad 2 (Mitte links), Grad 3 (unten rechts), Grad 4 (unten links) nur noch Reste der Basalmembran (Sterne); Unterbrechungen (Pfeile), immunhistochemische Färbung, Laminin, 1000fache Vergrößerung

3.4 Bakteriologische und mykologische Untersuchung

Die bakteriologische und mykologische Untersuchung wurde am Institut für Bakteriologie und Mykologie der veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig durchgeführt. Die Entnahme einer Probe für die mikrobiologische Untersuchung erfolgte zeitgleich mit der für die histologische Untersuchung am Tag der Entnahme sowie an den Tagen 1, 90 und 180. Die kryokonservierten Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und ein dreieckiges Stück Trägermaterial inklusive AM mit einer Kantenlänge von circa 3 mm steril

entnommen und in ein BU- Probenröhrchen verbracht. Die Proben wurden im Hinblick auf aerobe und anaerobe wachsende Bakterien sowie Pilze untersucht.

3.5 Statistische Auswertung

Die Auswertung der morphologischen Ergebnisse erfolgte unter Verwendung der Statistik-/Ökonometriesoftware EViews 10.0, ergänzt durch Datenerfassung und vorbereitende Datenaufbereitung in Microsoft Excel.

Zur Gewinnung eines Überblicks über die zeitliche Veränderung der morphologischen und morphometrischen Merkmale Dicke, Epithel, Stroma, Mikrovillisaum sowie der Integrität der Basalmembran der AM wurde eine lineare Regression in Form einer Trendregression durchgeführt. Dies bedeutet, dass für jedes Amnion die vier Tageswerte (für die Tage 0, 1, 90 und 180) des jeweiligen Merkmals auf eine Zeitvariable regressiert wurden. Der errechnete Steigungsparameter (Trendparameter) bringt dann zum Ausdruck, wie stark sich das jeweilige Merkmal tendenziell im Zeitverlauf pro Zeiteinheit verändert. Aufgrund der vorliegenden geringen Stichprobengröße eignen sich diese Analysen nicht zur Feststellung signifikanter Tendenzen. Für derartige Aussagen dienen die folgenden Testverfahren.

Zur Feststellung möglicher signifikanter Unterschiede in den Medianen der untersuchten Merkmale zwischen den Beobachtungszeitpunkten Tag 0 und 1, Tag 1 und 90, Tag 90 und 180 sowie Tag 0 und 180 kam eine Reihe etablierter Mediantests zur Anwendung. Es wurde sich auf den Median konzentriert, da dieser im Vergleich zum Mittelwert ein ausreißerrobustes Maß der zentralen Tendenz darstellt. Die Tests sind konkret: Wilcoxon/Mann-Whitney, Wilcoxon/Mann-Whitney (tie-adj.), Med.Chi-square, Adj. Med.Chi-square, Kruskal-Wallis, Kruskal-Wallis(tie-adj.) und van der Waerden. Diese Tests fußen jeweils auf unterschiedlichen Grundannahmen, sodass ein gleichgerichtetes Ergebnis aller Tests zusätzlich aufzeigen kann, dass die statistischen Schlußfolgerungen unabhängig von der Wahl des Testverfahrens sind.

Zuletzt wurde zur Untersuchung des potenziellen Zusammenhangs zwischen der Dicke und der Stromaalteration für jeden Beobachtungszeitpunkt eine lineare Querschnittsregression der Dicke auf die Stromabeschaffenheit durchgeführt. Der Steigungsparameter dieser Regression bringt dann tendenziell die Dickeveränderung pro Stromagrad zum Ausdruck.

Als Signifikanzniveau wurde für alle Testverfahren 95 % festgelegt. Folglich ergibt sich ein p-Wert von 0,05.

4 Ergebnisse

Es wurden 26 Amnien aus 14 Kaiserschnitten untersucht. Bei allen Tieren musste aufgrund einer Dystokie eine Sectio caesarea durchgeführt werden. Unter den operierten Hündinnen befanden sich vier Chihuahuas, vier Französische Bulldoggen, ein Boxer, ein Scottish Terrier, ein Deutscher Schäferhund, ein Rhodesian Ridgeback, ein Border Colliemischling, sowie ein Hund bei dem die Rasse nicht bekannt ist. Alle Hündinnen überlebten den Eingriff. Von den insgesamt 69 Welpen waren 55 vital. 14 Welpen waren lebensschwach beziehungsweise konnten nur tot entwickelt werden. Bei der Präparation der Amnien fiel auf, dass es sich hierbei um sehr fragiles Gewebe handelt, welches bei Manipulation sehr leicht einreißt.

4.1 Histologische Ergebnisse

Die histologischen Untersuchungen dienten der Beurteilung der Amnionmembranen in Bezug auf einen möglichen Qualitätsverlust über die Zeit der Kryokonservierung.

4.1.1 Dickenmessung der Amnionmembran

Anhand der PAS-Reaktion wurde bei den Proben der Tage 0, 1, 90 sowie 180 jeder Amnionmembran die Dicke an fünf repräsentativen Stellen des Präparates (P) ausgemessen. Die Tabelle 4 sowie die Abbildung 14 zeigen die Ergebnisse der Amniondickenmessung bei 26 Amnien aus 14 Kaiserschnitten an Tag 0, also der frischen und fixierten AM und denen an Tag 1, 90 sowie 180, also den kryokonservierten Proben. In der Tabelle 4 sind die berechneten Median beziehungsweise Mittelwerte der fünf Meßwerte jeder Probe zu den vier Untersuchungszeitpunkten abgebildet, während die Abbildung 14 die Mediane aller Amnionproben zu den vier Untersuchungszeitpunkten zeigt. Die Abbildung 15 zeigt die Trendregression der Dicke der AM. Hieraus wird ersichtlich, dass 17 der 26 untersuchten Amnien einen negativen Trendparameter aufweisen, die Dicke also bei diesen Proben im zeitlichen Verlauf tendenziell abnimmt. Bei den verbleibenden 9 Amnien zeichnet sich eher ein positiver Trend, also eine Dickenzunahme ab. Über alle Amnien gesehen sinkt die Dicke im Median allerdings um $0,69\ \mu\text{m}$ pro untersuchtem Zeitfenster. Sie nimmt also im Median von Tag 0 zu Tag 1, von Tag 1 zu Tag 90 sowie von Tag 90 zu 180 um $0,69\ \mu\text{m}$ ab. Bei der vergleichenden Untersuchung der Medianwerte der Dicke an Tag 0, 1, 90 und 180 mit Hilfe der Medianvergleichstests in der Tabelle 5 konnte lediglich zwischen Tag 0 und 1 ($p = 0,03$) ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Folglich konnte im Median zwischen den Tagen 1 und 90, 90 und 180 sowie 0 und 180 kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Dicke dokumentiert werden.

Tabelle 4: Medianwerte (x_{med}) und Mittelwerte (\bar{x}) der Dickenmessung der fünf ausgemessenen Stellen jeder Amnionprobe (P) an Tag 0, 1, 90, 180 in μm

Amnion	P0		P1		P90		P180	
	x_{med}	\bar{x}	x_{med}	\bar{x}	x_{med}	\bar{x}	x_{med}	\bar{x}
A2	10,25	9,80	5,38	5,50	9,80	10,32	6,04	6,42
A4	11,59	10,84	5,78	6,20	6,13	6,46	4,86	5,10
B1	10,45	10,19	7,98	7,79	10,51	10,04	8,13	8,22
C1	10,73	10,47	10,22	10,04	14,64	14,73	13,29	13,51
D1	11,20	11,28	9,66	9,87	12,53	12,02	10,13	9,90
D2	13,44	12,60	8,26	8,68	6,80	6,60	6,11	5,82
E1	12,17	12,80	10,34	10,15	8,46	8,75	8,69	8,15
E2	14,18	14,84	10,05	12,10	9,70	9,78	8,13	8,37
E3	10,35	9,71	10,76	10,66	11,57	12,64	7,78	7,26
F1	12,22	13,47	7,26	7,89	9,04	10,28	6,35	6,50
F2	8,70	9,43	8,03	9,67	9,06	8,65	4,70	4,37
H1	13,20	15,40	11,57	11,81	6,82	6,62	6,13	5,93
H2	14,77	14,22	12,17	12,42	6,82	7,30	7,11	7,19
K1	7,60	7,42	5,25	5,67	6,80	6,64	4,79	5,48
M1	8,85	8,99	5,97	7,03	14,21	14,70	7,94	7,70
M2	12,03	12,45	10,52	9,98	7,91	8,34	8,42	7,74
T1	12,33	13,19	10,48	10,49	12,41	12,73	16,29	15,60
U1	15,76	17,26	96,88	102,68	50,62	50,51	39,01	38,18
V1	14,97	13,91	9,43	8,71	12,17	12,27	15,85	26,64
V2	16,43	17,17	8,37	8,97	9,58	10,90	18,83	18,21
V3	40,08	39,29	19,89	18,36	26,60	24,29	28,97	30,17
W1	24,83	23,74	53,56	47,65	31,20	41,25	48,68	50,82
W2	34,89	32,68	20,09	20,51	16,61	17,61	30,34	31,26
W3	20,15	18,95	30,65	30,92	11,31	13,90	26,40	30,10
X1	25,00	24,10	30,84	33,18	72,8	74,73	46,90	50,70
X2	22,38	23,80	31,00	30,10	59,82	60,7	45,67	43,10

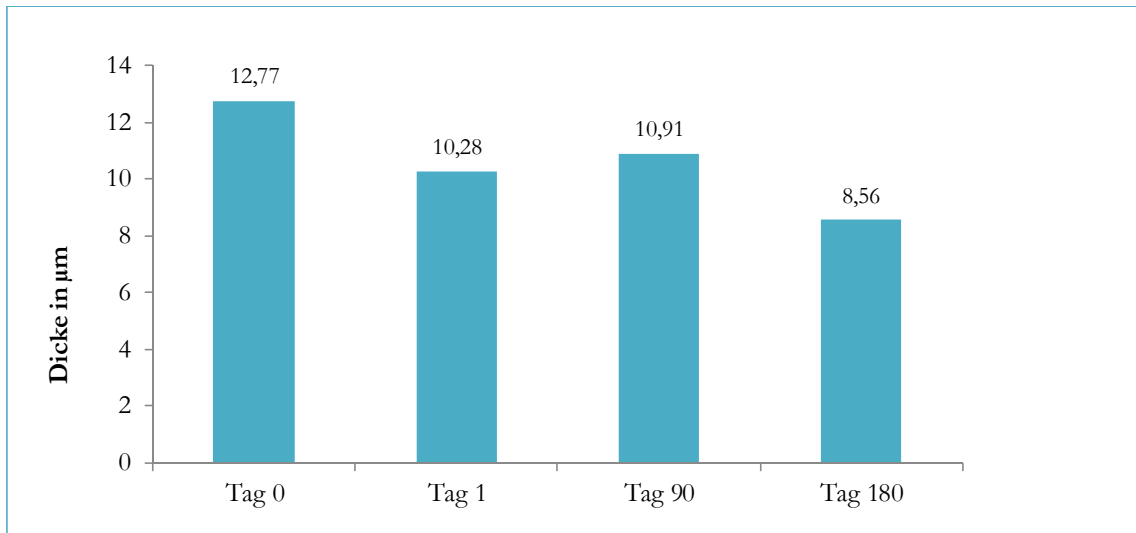


Abbildung 14: Dickenmessung der Amnionmembran in μm . Darstellung der Medianwerte aller Amnionmembranen an Tag 0, 1, 90, 180

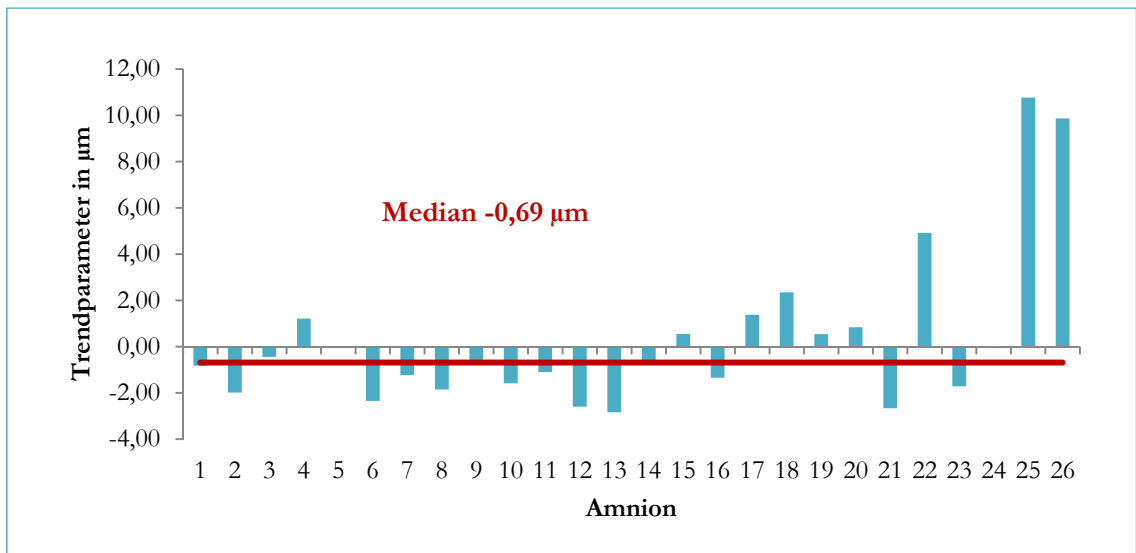


Abbildung 15: Trendregression der Dicke aller 26 Amnionmembranen sowie Angabe des Medianwertes ($-0,69 \mu\text{m}$) der Trendparameter

Tabelle 5: p-Werte der Medianvergleichstests für die Dicke der Amnionmembranen. Verglichen wurde zwischen Tag 0 und 1, Tag 1 und 90, Tag 90 und 180 sowie Tag 0 und 180

	Tag 0 vs. Tag 1	Tag 1 vs. Tag 90	Tag 90 vs. Tag 180	Tag 0 vs. Tag 180
Wilcoxon/Mann-Whitney	0,0338	0,6148	0,3897	0,1358
Wilcoxon/Mann-Whitney (tie-adj.)	0,0338	0,6147	0,3897	0,1358
Med.Chi-square	0,0055	0,5791	0,5791	0,2673
Adj. Med.Chi-square	0,0126	0,7815	0,7815	0,4054
Kruskal-Wallis	0,0330	0,6083	0,3847	0,1334
Kruskal-Wallis (tie-adj.)	0,0330	0,6083	0,3846	0,1334
van der Waerden	0,0545	0,5418	0,2522	0,1705
Median-p-Wert über alle Tests	0,0330	0,6083	0,3897	0,1358

4.1.2 Beurteilung der Basalmembran des Amnions

Die Beurteilung der Basalmembran der Amnion erfolgte mit Hilfe einer immunhistologischen Färbung zur Darstellung des Glykoproteins Laminin. Auf einer Strecke von 2000 μm wurde sowohl die Abgrenzbarkeit der darzustellenden Struktur bewertet als auch die Kontinuität resp. Diskontinuität anhand der sichtbaren Unterbrechungen der Immunreaktionslinie der BM, die auf der Messstrecke gezählt wurden. Die Abgrenzbarkeit konnte von 3 (gut) über 2 (mäßig) und 1 (schlecht) bis 0 (nicht abgrenzbar) bewertet werden. Die ausgezählten Unterbrechungen der Immunreaktionslinie der BM wurden in 5 Kategorien von 0 (0-4), 1 (5-9), 2 (10-14), 3 (15-19) sowie 4 (≥ 20) eingeteilt. Sowohl die Abgrenzbarkeit als auch die Kontinuität der BM wurden bei einer 1000fachen Vergrößerung bewertet. Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen. Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, zeigen die Proben der Tage 0, 1 und 180 im Median eine mäßige Abgrenzbarkeit der BM, während die Proben an Tag 90 im Median eine mäßige bis schlechte Abgrenzbarkeit derselbigen aufweisen. Die Abbildungen 16 bis 20 zeigen jeweils ein Beispiel (bzw. zwei Beispiele an Tag 90) der medianen Abgrenzbarkeiten der BM an den einzelnen Untersuchungstage.

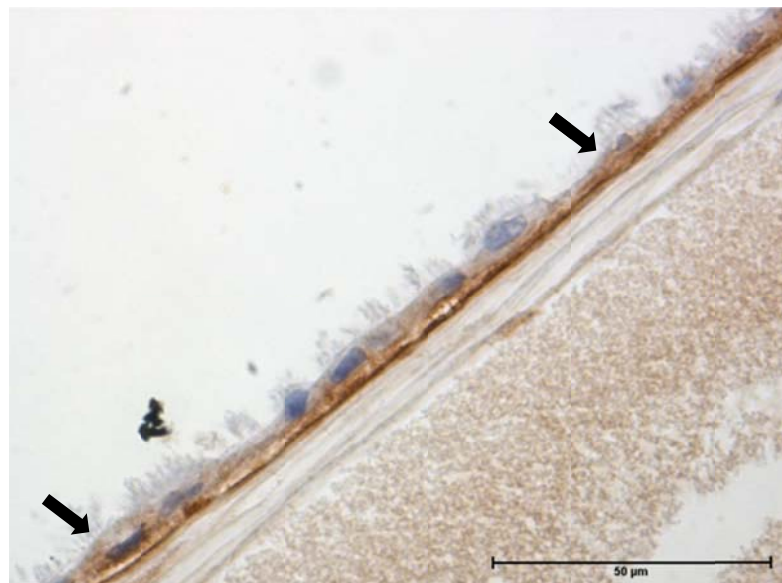


Abbildung 16: Tag 0, Abgrenzbarkeit der Basalmembran Grad 2 (mäßig), da teilweise Übertritt des Chromogens in die Epithelzellen (Pfeile), immunhistologische Färbung, Laminin, 1000fache Vergrößerung



Abbildung 17: Tag 1, Abgrenzbarkeit der Basalmembran Grad 2 (mäßig), da Übertritt des Chromogens in die Epithelzellen (Pfeile) immunhistologische Färbung, Laminin, 1000fache Vergrößerung



Abbildung 18: Tag 90, Abgrenzbarkeit der Basalmembran Grad 1 (schlecht), da sehr schwache Anfärbung und teilweise Chromogen in den Epithelzellen (Pfeile), Basalmembran teilweise nicht erkennbar (Sterne), immunhistologische Färbung, Laminin, 1000fache Vergrößerung

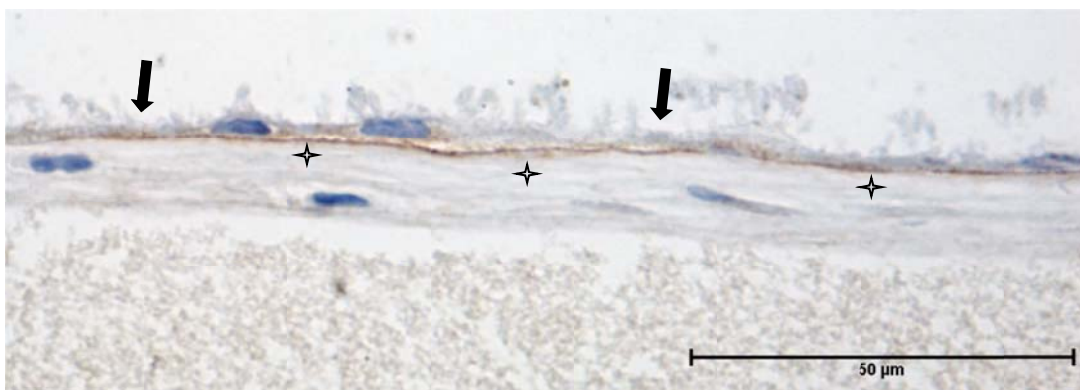


Abbildung 19: Tag 90, Abgrenzbarkeit der Basalmembran Grad 2 (mäßig), da relativ schwache Anfärbung (Pfeile), Basalmembran aber überall sichtbar (Sterne), immunhistologische Färbung, Laminin, 1000fache Vergrößerung

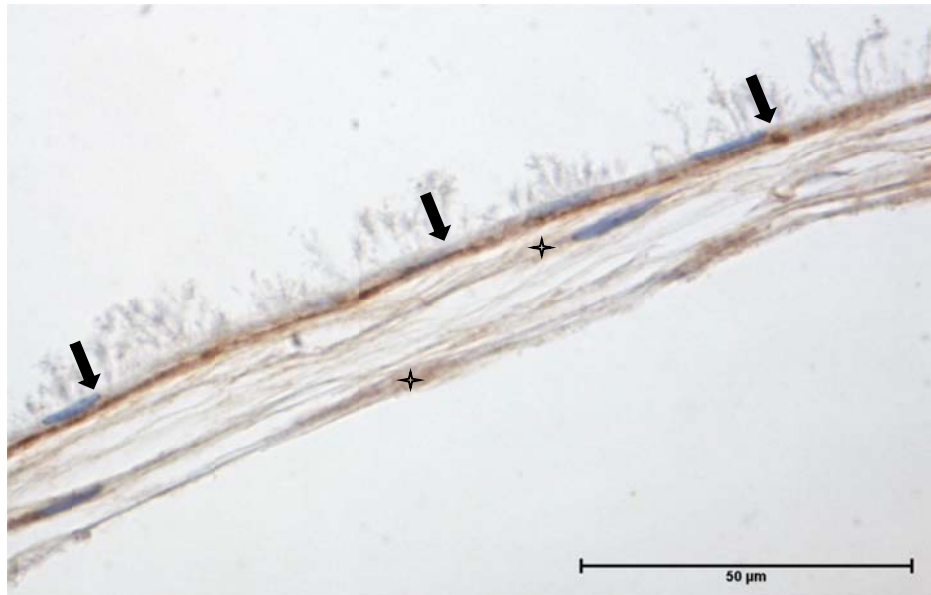


Abbildung 20: Tag 180, Abgrenzbarkeit der Basalmembran Grad 2 (mäßig), da auch das Stroma etwas mitgefärbt ist (Sterne), Basalmembran aber durchgehend erkennbar (Pfeile), immunhistologische Färbung, Laminin, 1000fache Vergrößerung

In der Abbildung 28 ist die Trendregression der Abgrenzbarkeit der BM dargestellt. Daraus lässt sich ablesen, dass 9 der 26 untersuchten Amnien in diesem Punkt einen positiven Trendparameter aufweisen, die Abgrenzbarkeit sich also bei diesen Proben im zeitlichen Verlauf tendenziell verbessert. Bei 9 Amnien zeigt sich ein negativer Trendparameter. Bei ihnen nimmt die Abgrenzbarkeit über die Zeit also tendenziell ab. Bei acht Amnien konnte keine Tendenz in der Abgrenzbarkeit der BM festgestellt werden. Von diesen acht konnte allerdings bei vier Amnien die BM zu keinem Untersuchungszeitpunkt abgegrenzt werden. Betrachtet man alle Amnien so konnte im Median weder eine Verbesserung noch eine Verschlechterung der Abgrenzbarkeit der BM pro untersuchtem Zeitfenster festgestellt werden. Bei der vergleichenden Untersuchung der Medianwerte der Abgrenzbarkeit an Tag 0, 1, 90 und 180 in Tabelle 7 konnte mit Hilfe der oben genannten Medianvergleichstests im Median zwischen den Tagen 0 und 1, 1 und 90, 90 und 180 sowie 0 und 180 kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Kontinuität der BM sind in Abbildung 29 dargestellt. Hieraus wird ersichtlich, dass bei den Proben an Tag 1 und 180 mehr Unterbrechungen der Immunreaktionslinie der BM nachgewiesen werden konnten als bei den Proben an Tag 0 und 90. Die Abbildungen 22 und 24 zeigen Beispiele der Tage 1 und 180 mit einem Score von 2, während die Abbildungen 21 und 23 Proben der Tage 0 und 90 mit einem Score von 1 zeigen.



Abbildung 21: Tag 0, Unterbrechungen der Basalmembran Score 1 (5-9 Unterbrechungen/2000 μm), Unterbrechung (Pfeil), immunhistologische Färbung, Laminin, 1000fache Vergrößerung



Abbildung 22: Tag 1, Unterbrechungen der Basalmembran Score 2 (10-14 Unterbrechungen/2000 μm), Unterbrechungen (Pfeile), immunhistologische Färbung, Laminin, 1000fache Vergrößerung



Abbildung 23: Tag 90, Unterbrechungen der Basalmembran Score 1 (5-9 Unterbrechungen/2000 μm), Unterbrechung (Pfeil), immunhistologische Färbung, Laminin, 1000fache Vergrößerung



Abbildung 24: Tag 180, Unterbrechungen der Basalmembran Score 2 (10-14 Unterbrechungen/2000 μm), hier zeigt sich eine lange Unterbrechung der Immunreaktionslinie (Sterne), immunhistologische Färbung, Laminin, 1000fache Vergrößerung

In einigen Proben (diese wurden allerdings nicht in Zahlen erfasst), wie in Abbildung 25 gezeigt, kommt es zu einem Ablösen des Epithels samt der Basalmembran vom Stroma, während bei anderen Proben, wie in Abbildung 26 dargestellt, die Basalmembran mit dem Stroma in Verbindung bleibt.

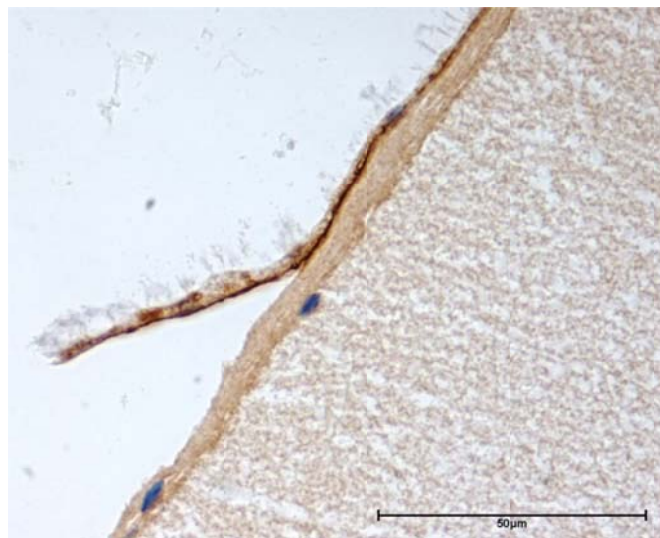


Abbildung 25: Tag 1, Abgrenzbarkeit Grad 3, Epithel hebt sich samt der Basalmembran vom Stroma ab, immunhistologische Färbung, Laminin, 1000fache Vergrößerung

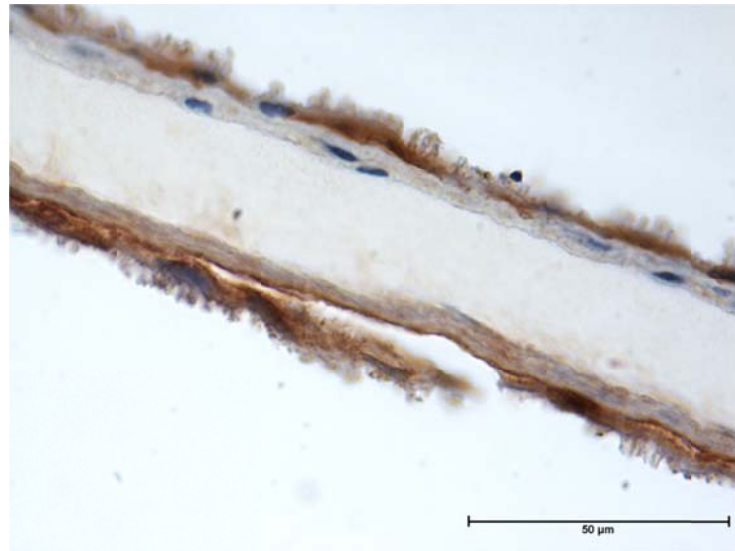


Abbildung 26: Tag 180, Abgrenzbarkeit Grad 2, Epithel hebt sich von der Basalmembran ab, die Basalmembran verbleibt auf dem Stroma, immunhistologische Färbung, Laminin, 1000fache Vergrößerung

In der Abbildung 30 ist die Trendregression der Anzahl der Unterbrechungen der BM dargestellt. Daraus lässt sich ablesen, dass 11 der 26 untersuchten Amnien wiesen in diesem Merkmal einen positiven Trendparameter auf, das heißt, die Anzahl der Unterbrechungen steigt bei diesen Proben im zeitlichen Verlauf tendenziell an. Bei sieben Amnien zeigt sich ein negativer Trendparameter. Bei ihnen nimmt die Zahl der Unterbrechungen über die Zeit also tendenziell eher ab. Bei acht Amnien konnte keine Tendenz in der Anzahl der Unterbrechungen der BM festgestellt werden. Allerdings konnten davon vier Amnien nicht beurteilt werden, da die BM hier zu keinem Untersuchungszeitpunkt abgrenzbar war und somit auch keine möglichen Unterbrechungen der Immunreaktionslinie ausgezählt werden konnten. Bezieht man alle Amnien mit ein, so konnte im Median ein geringgradig positiver Trendparameter von 0,07 ermittelt werden. Dies bedeutet, dass die Anzahl der Unterbrechungen der BM im Median um 0,07 Score-Einheiten pro untersuchtem Zeitfenster steigt. Sie nimmt also im Median von Tag 0 zu Tag 1, von Tag 1 zu Tag 90 sowie von Tag 90 zu 180 um 0,07 Score-Einheiten zu. Dies entspricht grob einem Zahlenwert von 0,3 Unterbrechungen. Bei der vergleichenden Untersuchung der Medianwerte der Unterbrechungen der BM an Tag 0, 1, 90 und 180 mit Hilfe der oben genannten Medianvergleichstests konnte in Tabelle 8 im Median zwischen den Tagen 0 und 1, 1 und 90, 90 und 180 sowie 0 und 180 kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Allerdings nähert sich der p-Wert zwischen Tag 90 und 180 ($p = 0,07$) dem festgelegten Signifikanzniveau an.

Tabelle 6: Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung der Basalmembran der Amnionmembranen an Tag 0, 1, 90 und 180. Beurteilt wurden die Abgrenzbarkeit sowie die Unterbrechungen der Basalmembran auf einer Strecke von 2000 μm bei einer 1000fachen Vergrößerung

Amnion	Abgrenzbarkeit der BM 100x				Unterbrechungen der BM auf 2000 μm 100x			
	0	1	90	180	0	1	90	180
A2	0	2	1	2	-	4	7	14
A4	2	0	0	2	18	-	-	16
B1	0	2	0	0	-	8	-	-
C1	3	3	0	3	6	14	-	6
D1	2	1	3	3	8	14	8	9
D2	2	2	1	0	15	13	19	-
E1	3	3	2	2	15	5	17	12
E2	2	2	3	3	9	10	1	11
E3	3	3	2	3	9	11	20	8
F1	0	0	0	0	-	-	-	-
F2	3	0	0	3	8	-	-	11
H1	3	3	2	1	14	16	34	-
H2	2	3	0	3	19	10	-	16
K1	2	3	3	0	12	11	25	-
M1	0	3	2	2	-	33	8	13
M2	3	2	3	3	9	18	6	6
T1	3	2	3	3	7	21	8	3
U1	0	3	3	3	-	2	2	13
V1	3	2	3	3	1	12	14	11
V2	3	0	1	3	9	-	6	10
V3	2	2	0	0	15	18	-	-
W1	0	0	0	0	-	-	-	-
W2	3	3	3	3	10	10	0	12
W3	3	3	3	2	0	7	3	16
X1	0	0	0	0	-	-	-	-
X2	0	0	0	0	-	-	-	-

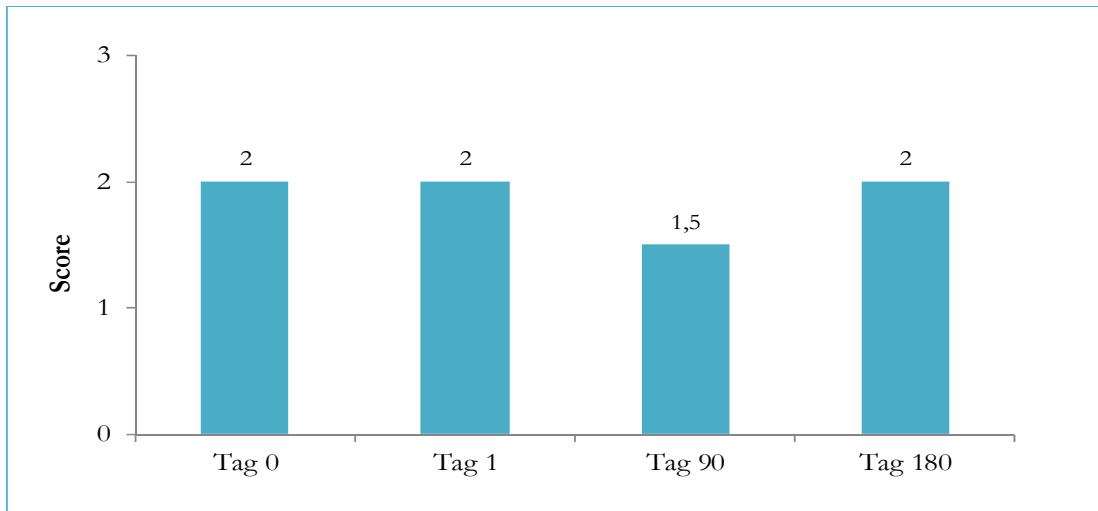


Abbildung 27: Darstellung der Medianscorewerte der Abgrenzbarkeit (3 = gut, 2 = mäßig, 1 = schlecht, 0 = nicht abgrenzbar) der der Basalmembran aller Amnionmembranen an Tag 0, 1, 90, 180

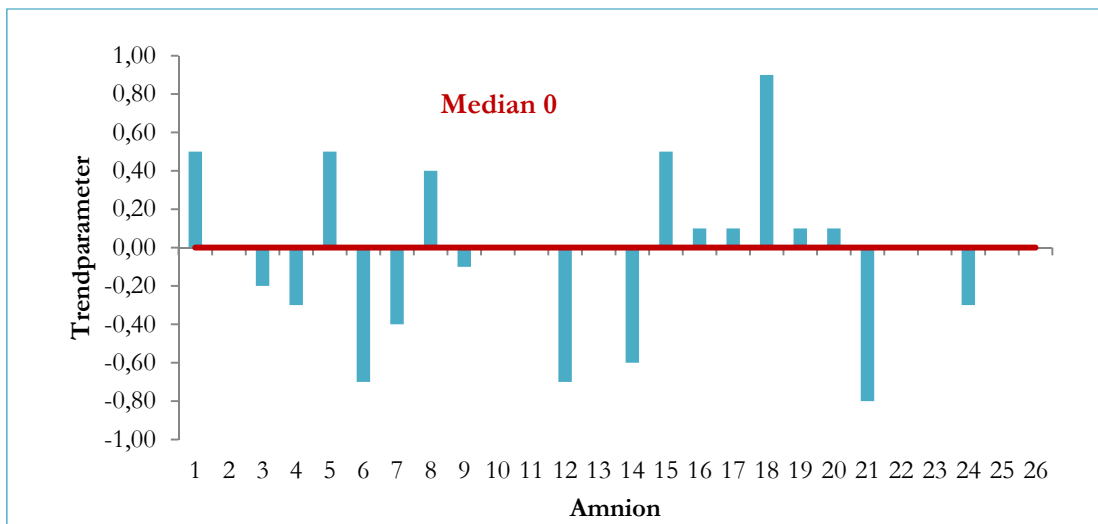


Abbildung 28: Trendregression der Abgrenzbarkeit der Basalmembran aller 26 Amnionmembranen sowie Angabe des Medianwertes (0) der Trendparameter

Tabelle 7: p-Werte der Medianvergleichstests für die Abgrenzbarkeit der Basalmembran der Amnionmembranen. Verglichen wurde zwischen Tag 0 und 1, Tag 1 und 90, Tag 90 und 180 sowie Tag 0 und 180

	Tag 0 vs. Tag 1	Tag 1 vs. Tag 90	Tag 90 vs. Tag 180	Tag 0 vs. Tag 180
Wilcoxon/Mann-Whitney	0,9344	0,4313	0,3999	0,9271
Wilcoxon/Mann-Whitney (tie-adj.)	0,9303	0,4078	0,3715	0,9220
Med.Chi-square	0,7775	0,7734	0,3965	0,7801
Adj. Med.Chi-square	1,0000	1,0000	0,5719	1,0000
Kruskal-Wallis	0,9271	0,4260	0,3948	0,9198
Kruskal-Wallis (tie adj.)	0,9226	0,4024	0,3663	0,9142
van der Waerden	0,8872	0,4098	0,3720	0,8578
Median-p-Wert über alle Tests	0,9271	0,4260	0,3948	0,9198

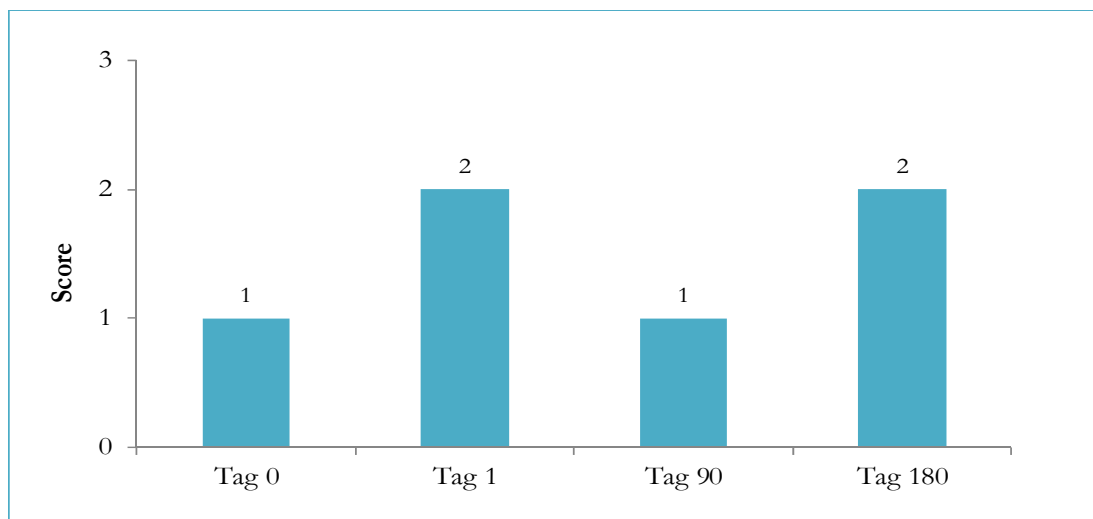


Abbildung 29: Darstellung der Medianscorewerte der Unterbrechungen (0 = 0-4, 1 = 5-9, 2 = 10-14, 3 = 15-19, 4 \geq 20) der Basalmembran aller Amnionmembranen an Tag 0, 1, 90, 180

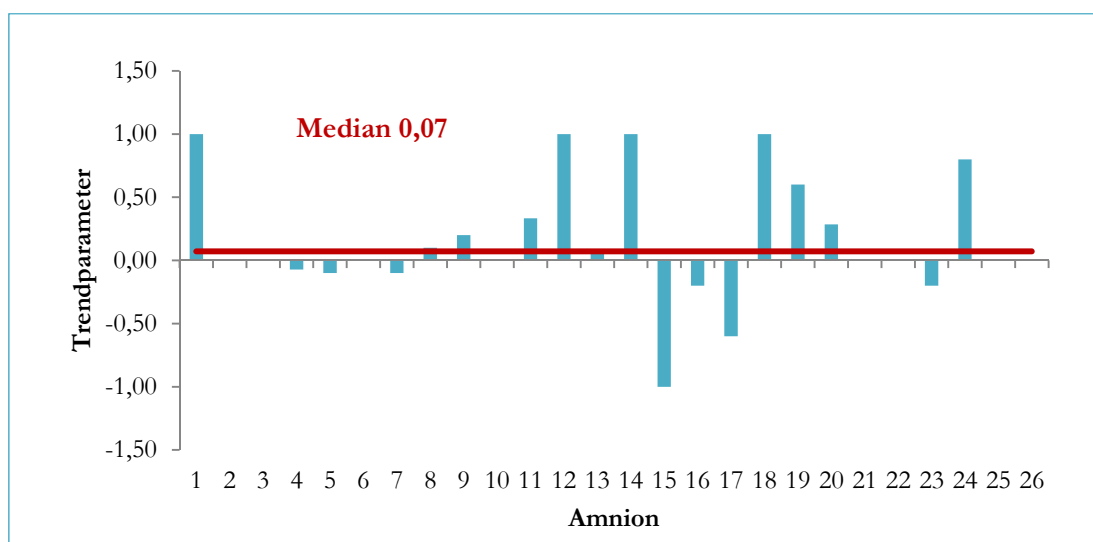


Abbildung 30: Trendregression der Unterbrechungen der Basalmembran aller 26 Amnionmembranen sowie Angabe des Medianwertes (0,07) der Trendparameter

Tabelle 8: p-Werte der Medianvergleichstests für die Unterbrechungen der Basalmembran der Amnionmembranen. Verglichen wurde zwischen Tag 0 und 1, Tag 1 und 90, Tag 90 und 180 sowie Tag 0 und 180

	Tag 0 vs. Tag 1	Tag 1 vs. Tag 90	Tag 90 vs. Tag 180	Tag 0 vs. Tag 180
Wilcoxon/Mann-Whitney	0,1300	0,4186	0,0858	0,2148
Wilcoxon/Mann-Whitney (tie-adj.)	0,1115	0,4077	0,0718	0,1899
Med.Chi-square	1,0000	0,6903	0,0183	0,0581
Adj. Med.Chi-square	0,6797	1,0000	0,0492	0,1296
Kruskal-Wallis	0,1249	0,4068	0,0812	0,2064
Kruskal-Wallis (tie-adj.)	0,1067	0,3958	0,0677	0,1818
van der Waerden	0,0908	0,4543	0,1232	0,2273
Median-p-Wert über alle Tests	0,1249	0,4186	0,0718	0,1899

4.1.3 Morphologische Beurteilung der Amnionmembran

Die morphologische Untersuchung der AM erfolgte anhand der PAS-Reaktion auf einer Strecke von 2000 μm eines Präparates wobei das Epithels, das Stroma sowie der Mikrovillisaum bei 400facher und 1000facher Vergrößerung bewertet wurden. Die Beurteilungszeitpunkte waren wiederum Tag 0, 1, 90 und 180. Das Amnionepithel wurde auf etwaige Degenerationsanzeichen hin untersucht und gemäß eines modifizierten Scores nach Chiu et al. (1970) kategorisiert. Auch das Stroma und der Mikrovillisaum wurden auf ihren Zustand hin beurteilt und daraufhin in 5 beziehungsweise 4 Kategorien eingeteilt. Die Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse dieser Auswertung. Betrachtet man die Epithelmorphologie, so ist in Abbildung 39 feststellbar, dass die Proben an Tag 0, 1, 90 und 180 im Median in die Kategorie 4 fallen. Hier zeigen, wie in den Abbildungen 31 bis 34 zu sehen ist, deutlich mehr als die Hälfte der Epithelzellen Anzeichen einer Degeneration oder haben den Kontakt zur BM beziehungsweise dem Stroma verloren.



Abbildung 31: Tag 0, Epithelmorphologie Grad 4, die Epithelzellen zeigen Pyknose (offener Pfeil), Zellyse (Pfeil) und Karyolyse (Pfeilspitzen), PAS-Färbung, 1000fache Vergrößerung

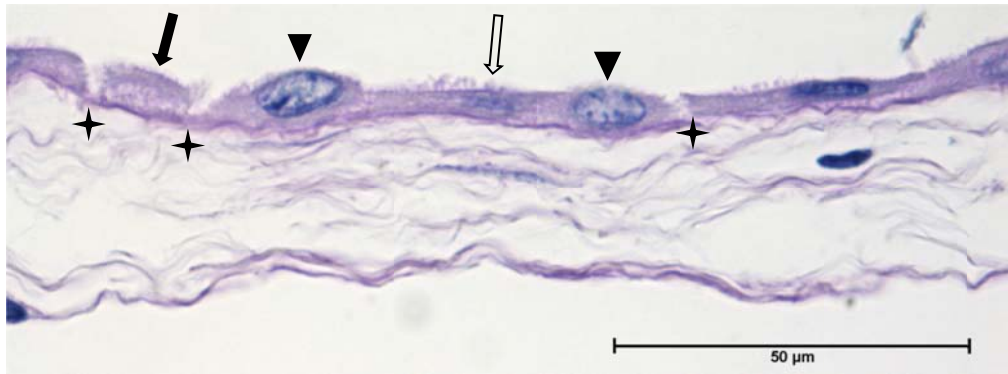


Abbildung 32: Tag 1, Epithelmorphologie Grad 4, die Epithelzellen zeigen Zellyse (Pfeil), Karyolyse (Pfeilspitzen) und Pyknose (offener Pfeil), der Epithelverband ist teilweise unterbrochen (Sterne), PAS-Färbung, 1000fache Vergrößerung

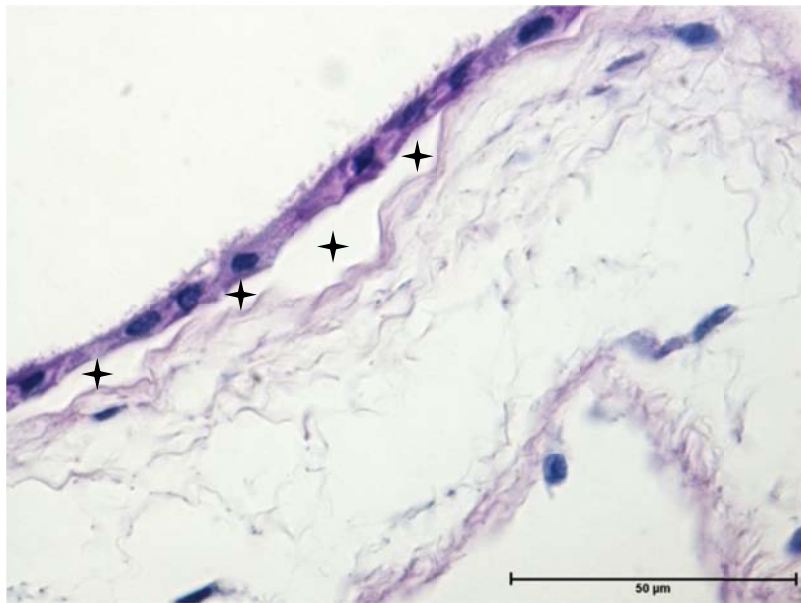


Abbildung 33: Tag 90, Epithelmorphologie Grad 4, die Epithelzellen zeigen an über 50 % eine Ablösung vom Stroma (Sterne), PAS-Färbung, 1000fache Vergrößerung

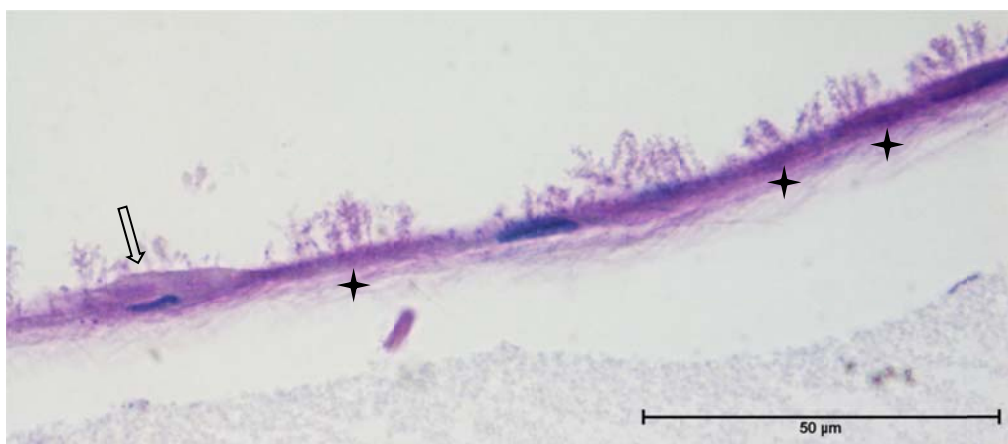


Abbildung 34: Tag 180, Epithelmorphologie Grad 4, die Epithelzellen zeigen Pyknose (offener Pfeil) und sind teilweise kernlos (Stern), PAS-Färbung, 1000fache Vergrößerung

Für die Epithelmorphologie zeigt die in Abbildung 40 dargestellte Trendregression für zehn Amnien einen positiven Trendparameter. Die Epithelalterationen nehmen in diesen Fällen also tendenziell zu. Bei elf Amnien zeigt sich ein negativer Trendparameter, sodass hier tendenziell eher eine Verbesserung der Epithelmorphologie über die Zeit stattfindet. Fünf der 26 Amnien zeigen im zeitlichen Verlauf keine Veränderungen der Epithelmorphologie. Über alle Amnien betrachtet, konnte im Median keine Veränderung der Epithelmorphologie der AM pro untersuchtem Zeitfenster festgestellt werden. Bei der vergleichenden Untersuchung der Medianwerte der Epithelmorphologie an Tag 0, 1, 90 und 180 mit Hilfe der Medianvergleichstests in Tabelle 10 konnte im Median zwischen den Tagen 0 und 1, 1 und 90, 90 und 180 sowie 0 und 180 kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Im Hinblick auf die Stromabeschaffenheit können im Median alle Proben der Tage 0, 1, 90 und 180 in die Kategorie 4 eingeteilt werden. Hier zeigt das Stroma, wie in den Abbildungen 35 und 36 zu sehen, auf über der Hälfte der untersuchten Strecke eine Spaltenbildung.

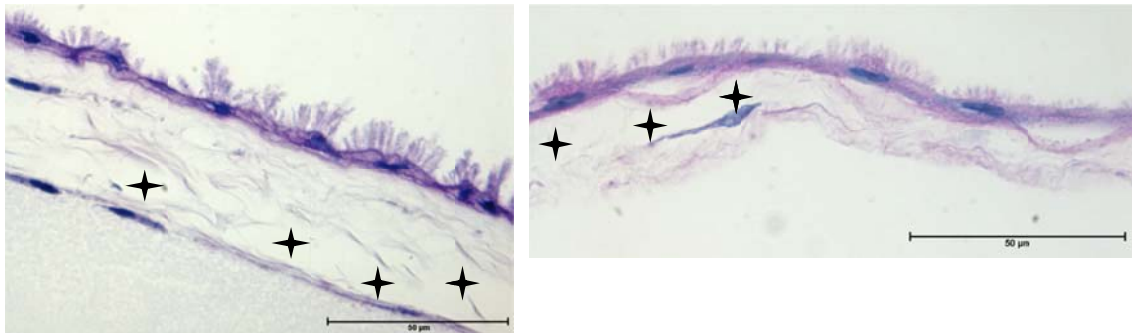


Abbildung 35: Tag 0 (links) und Tag 1 (rechts), Stromabeschaffenheit Grad 4, Spaltenbildung (Sterne), PAS-Reaktion, 1000fache Vergrößerung

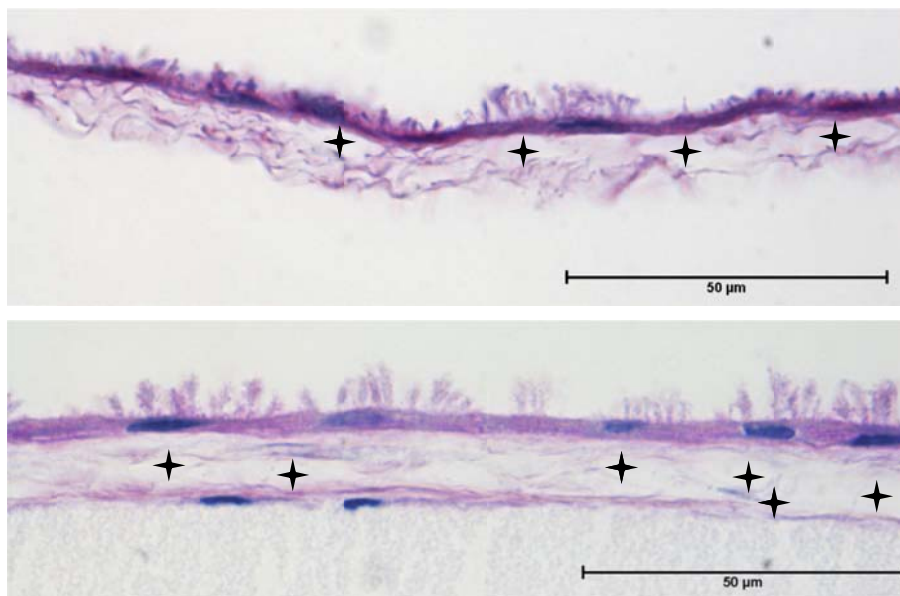


Abbildung 36: Tag 90 (oben) und Tag 180 (unten), Stromabeschaffenheit Grad 4, Spaltenbildung (Sterne), PAS-Reaktion, 1000fache Vergrößerung

Die Trendregression der Stromabeschaffenheit, welche in Abbildung 41 dargestellt ist, zeigt für alle Amnien im Median keine Veränderung pro untersuchtem Zeitfenster. Betrachtet man einzelne Amnien, so ist zu erkennen, dass acht Amnien einen positiven Trendparameter aufweisen, also sich deren Stromabeschaffenheit über die Zeit tendenziell verschlechtert, während neun Amnien durch einen negativen Trendparameter gekennzeichnet sind und sich ihre Stromabeschaffenheit im zeitlichen Verlauf tendenziell verbessert. Bei den verbleibenden neun Amnien kann über die Zeit durchschnittlich eher keine Veränderung der Stromabeschaffenheit festgestellt werden. Bei der vergleichenden Untersuchung der Medianwerte der Stromabeschaffenheit an Tag 0, 1, 90 und 180 mit Hilfe der Medianvergleichstests in Tabelle 11 zeigte sich im Median zwischen den Tagen 0 und 1, 1 und 90, 90 und 180 sowie 0 und 180 kein statistisch signifikanter Unterschied. Der Mikrovillisaum ist, wie in Abbildung 37 gezeigt, bei den Proben der Tage 0, 1 und 180 im Median schlecht erhalten. Sie fallen also in die Kategorie 3.

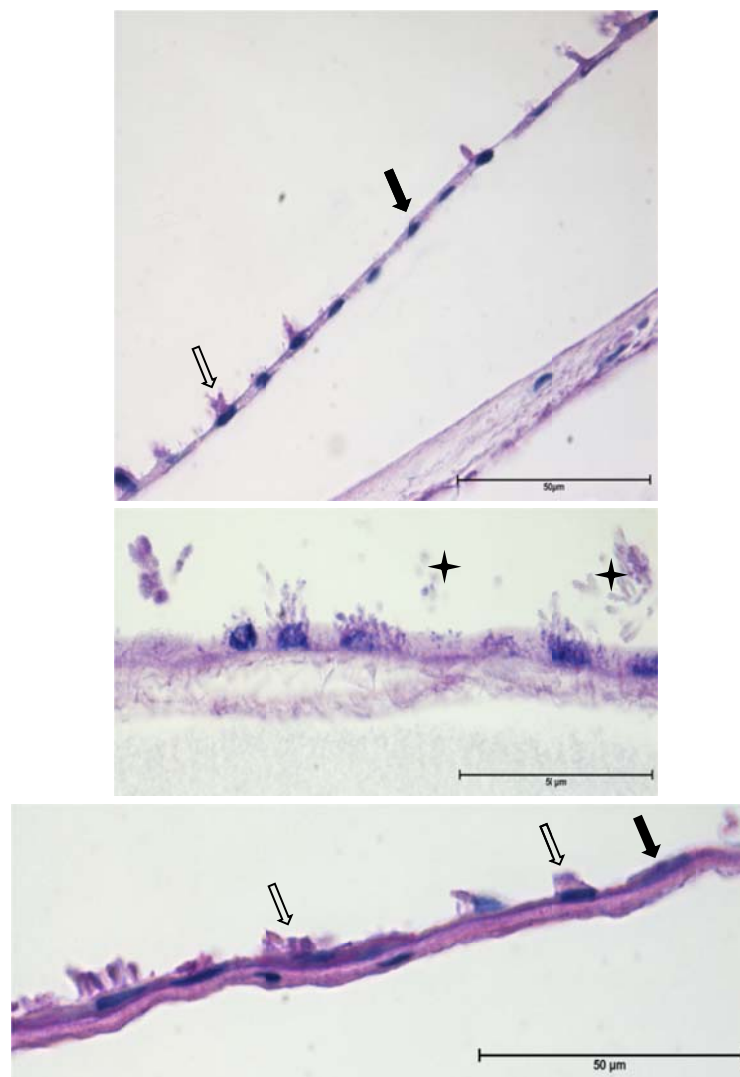


Abbildung 37: Tag 0 (oben), Tag 1 (mittig) und Tag 180 (unten), Erhalt des Mikrovillisaums Grad 3, abgelöste Mikrovilli (Sterne), Zellen ohne Mikrovilli (Pfeile), teilweise plumpe Reste der Mikrovilli (leere Pfeile), PAS-Reaktion, 1000fache Vergrößerung

Die Proben des Tages 90 zeigen, wie in Abbildung 38 zu sehen ist, im Median einen mäßig erhaltenen Mikrovillisaum und sind so in die Kategorie 2 einzuordnen.

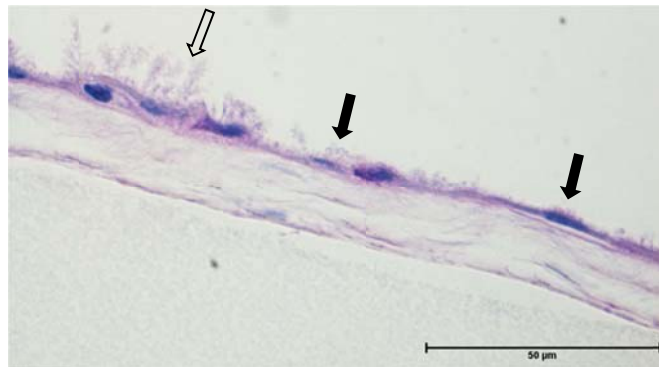


Abbildung 38: Tag 90, Erhalt des Mikrovillisaums Grad 2, sehr kurze Mikrovilli (Pfeile), gut erhaltene Mikrovilli (leere Pfeile), PAS-Reaktion, 1000fache Vergrößerung

Durch die in Abbildung 42 dargestellte Trendregression ergab sich für den Erhalt des Mikrovillisaums folgendes Bild: Zehn Amnien zeigen einen positiven Trendparameter und damit durchschnittlich eine Verschlechterung des Mikrovillisaums bezüglich seines Erhalts über die Zeit der Untersuchung. Sechs Amnien sind durch einen negativen Trendparameter gekennzeichnet, zeigen also mehrheitlich eine Verbesserung der Erhaltung des Mikrovillisaums. Die verbleibenden zehn Amnien zeigen im zeitlichen Verlauf keinerlei Veränderungen bezüglich der Mikrovillisaumerhaltung. Auch in der Gesamtheit der Amnien zeigen diese pro untersuchtem Zeitfenster tendenziell weder eine Verbesserung noch eine Verschlechterung der Erhaltung des Mikrovillisaums. Bei der vergleichenden Untersuchung der Medianwerte des Erhalts des Mikrovillisaums an Tag 0, 1, 90 und 180 mit Hilfe der Medianvergleichstests in Tabelle 12 konnte im Median zwischen den Tagen 0 und 1, 1 und 90, 90 und 180 sowie 0 und 180 kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

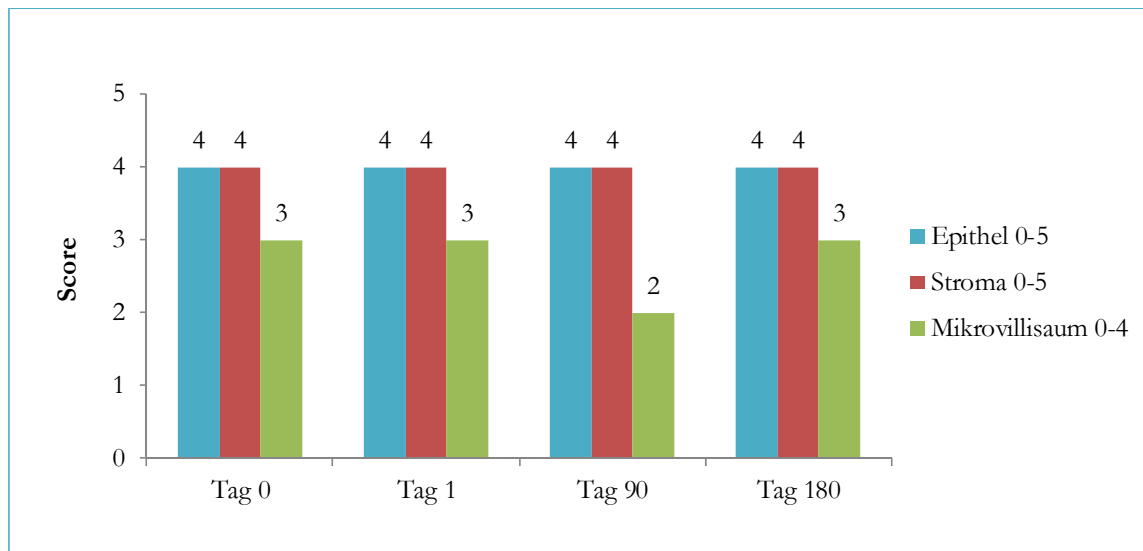


Abbildung 39: Darstellung der Medianscorewerte der drei Bestandteile (Epithel, Stroma, Mikrovillisaum) der Amnionmembranen an Tag 0, 1, 90 und 180

Epithelmorphologie (0 = Epithel vollständig intakt, 1 = einzelne Epithelzellen sind von der Basalmembran/dem Stroma gelöst oder zeigen Anzeichen einer Degeneration, 2 = deutlich weniger als die Hälfte der Epithelzellen haben den Kontakt zur BM/dem Stroma verloren oder zeigen Anzeichen einer Degeneration, 3 = die Hälfte der Epithelzellen haben den Kontakt zur BM/dem Stroma verloren oder zeigen Anzeichen einer Degeneration, 4 = deutlich mehr als die Hälfte der Epithelzellen haben den Kontakt zur BM/dem Stroma verloren oder zeigen Anzeichen einer Degeneration, 5 = vollständiges Ablösen der Epithelzellen von der BM/dem Stroma und/oder alle Epithelzellen zeigen eine ausgeprägte Degeneration)

Stromabeschaffenheit (0 = Stroma vollständig intakt, 1 = Stroma zeigt an einzelnen Stellen Spaltenbildung, 2 = Stroma zeigt an weniger als der Hälfte eine Spaltenbildung, 3 = Stroma zeigt an der Hälfte eine Spaltenbildung, 4 = Stroma zeigt an über der Hälfte eine Spaltenbildung, 5 = nahezu kein Stroma mehr vorhanden)

Erhalt des Mikrovillisaums (0 = vollständig erhalten, 1 = gut erhalten, 2 = mäßig erhalten, 3 = schlecht erhalten, 4 = nicht erhalten)

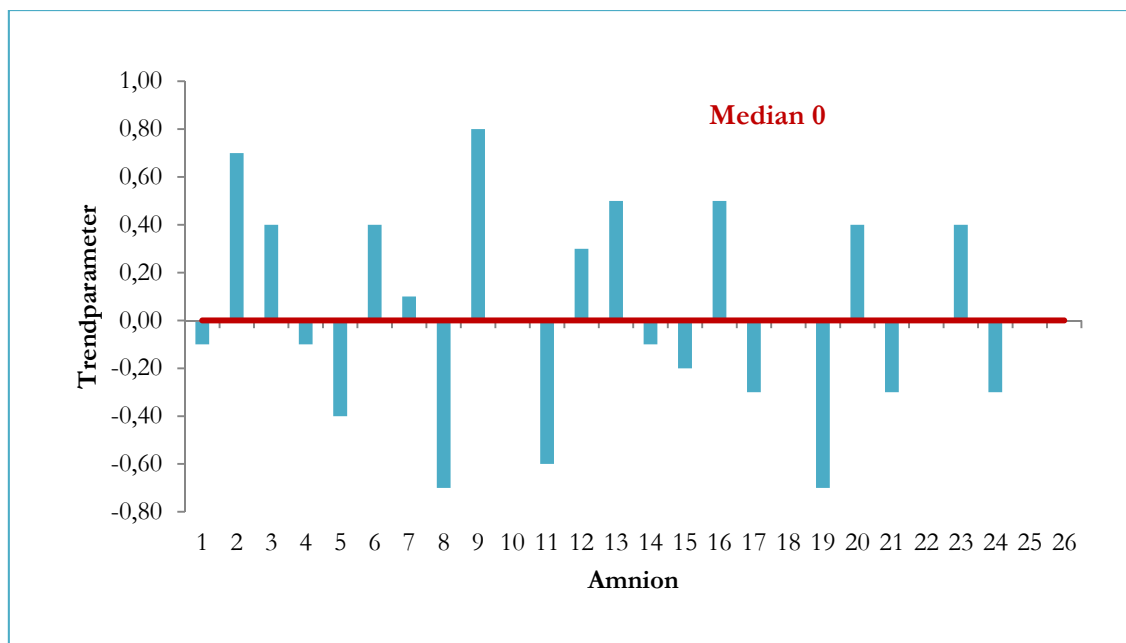


Abbildung 40: Trendregression der Epithelmorphologie aller 26 Amnionmembranen sowie Angabe des Medianwertes (0) der Trendparameter

Tabelle 10: p-Werte der Medianvergleichstests für die Epithelmorphologie der Amnionmembranen. Verglichen wurde zwischen Tag 0 und 1, Tag 1 und 90, Tag 90 und 180 sowie Tag 0 und 180

	Tag 0 vs. Tag 1	Tag 1 vs. Tag 90	Tag 90 vs. Tag 180	Tag 0 vs. Tag 180
Wilcoxon/Mann-Whitney	0,6671	0,5398	0,7143	0,9781
Wilcoxon/Mann-Whitney (tie-adj.)	0,6550	0,5236	0,7022	0,9774
Med.Chi-square	1,0000	0,5318	1,0000	0,5318
Adj. Med.Chi-square	0,7638	0,7546	0,7420	0,7546
Kruskal-Wallis	0,6605	0,5338	0,7075	0,9708
Kruskal-Wallis (tie-adj.)	0,6481	0,5174	0,6951	0,9698
van der Waerden	0,6249	0,5089	0,7042	0,9410
Median-p-Wert über alle Tests	0,6605	0,5318	0,7075	0,9698

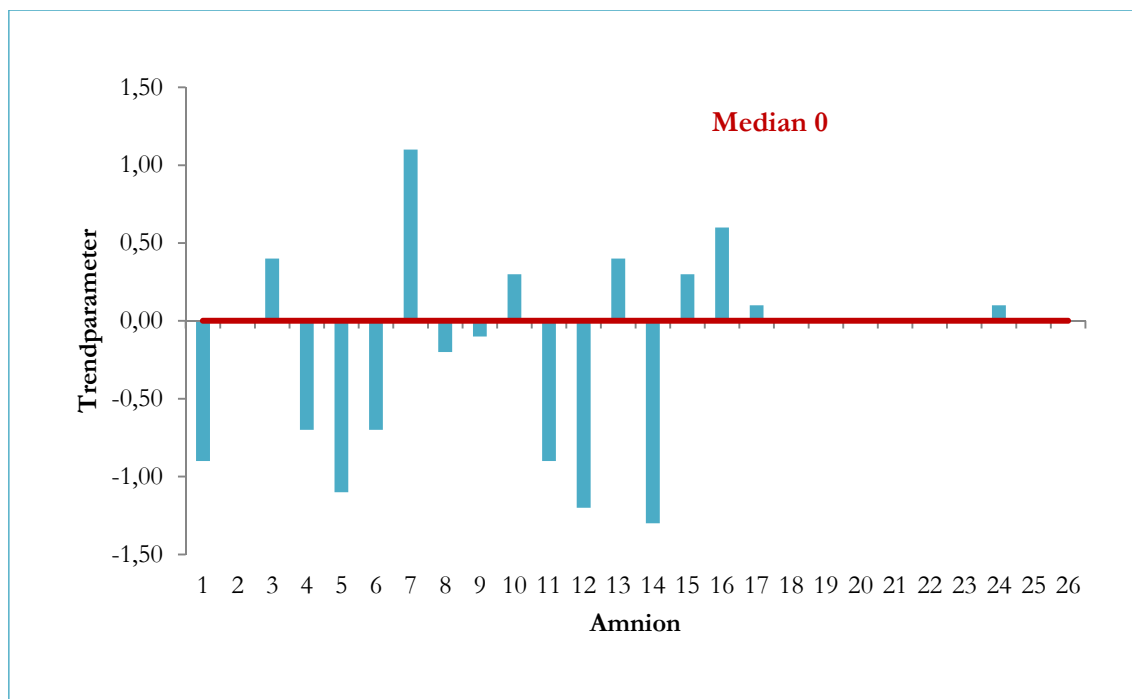


Abbildung 41: Trendregression der Stromabeschaffenheit aller 26 Amnionmembranen sowie Angabe des Medianwertes (0) der Trendparameter

Tabelle 11: p-Werte der Medianvergleichstests für die Stromabeschaffenheit der Amnionmembranen. Verglichen wurde zwischen Tag 0 und 1, Tag 1 und 90, Tag 90 und 180 sowie Tag 0 und 180

	Tag 0 vs. Tag 1	Tag 1 vs. Tag 90	Tag 90 vs. Tag 180	Tag 0 vs. Tag 180
Wilcoxon/Mann-Whitney	0,8548	0,5278	0,8692	0,9416
Wilcoxon/Mann-Whitney (tie-adj.)	0,8227	0,4906	0,8598	0,9331
Med.Chi-square	0,1492	0,6381	1,0000	0,0744
Adj. Med.Chi-square	0,4708	1,0000	0,6642	0,2342
Kruskal-Wallis	0,8476	0,5218	0,8620	0,9344
Kruskal-Wallis (tie-adj.)	0,8140	0,4844	0,8521	0,9225
van der Waerden	0,6339	0,6204	0,8921	0,8223
Median-p-Wert über alle Tests	0,8140	0,5278	0,8620	0,9225

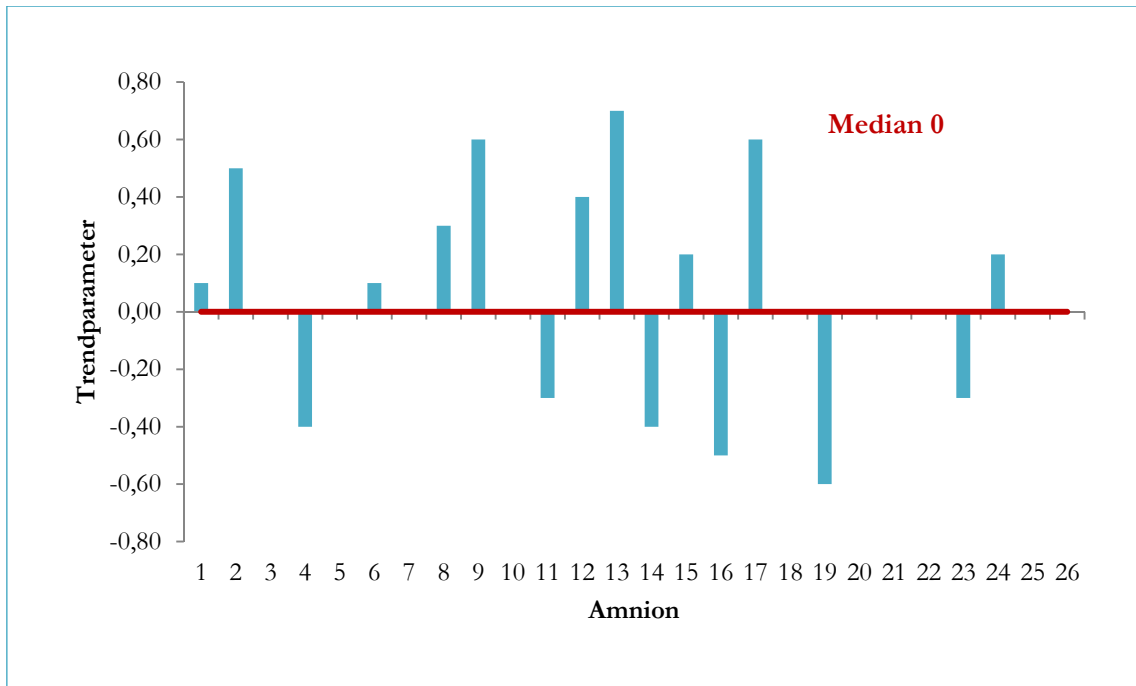


Abbildung 42: Trendregression des Erhalts des Mikrovillisaums aller 26 Amnionmembranen sowie Angabe des Medianwertes (0) der Trendparameter

Tabelle 12: p-Werte der Medianvergleichstests für den Erhalt des Mikrovillisaums der Amnionmembranen. Verglichen wurde zwischen Tag 0 und 1, Tag 1 und 90, Tag 90 und 180 sowie Tag 0 und 180

	Tag 0 vs. Tag 1	Tag 1 vs. Tag 90	Tag 90 vs. Tag 180	Tag 0 vs. Tag 180
Wilcoxon/Mann-Whitney	0,8405	0,9927	0,552	0,7557
Wilcoxon/Mann-Whitney (tie-adj.)	0,8347	0,9925	0,5361	0,7469
Med.Chi-square	0,3751	0,5791	0,5791	0,5599
Adj. Med.Chi-square	0,5544	0,7815	0,7815	0,7707
Kruskal-Wallis	0,8333	0,9854	0,5459	0,7488
Kruskal-Wallis (tie adj.)	0,8274	0,9849	0,5298	0,7397
van der Waerden	0,8742	0,9371	0,4965	0,5826
Median-p-Wert über alle Tests	0,8333	0,9849	0,5459	0,7469

4.1.4 Zusammenhang zwischen der Dicke und der Stromabschafftheit der Amnionmembran

Anhand der Querschnittsregression der Dicke auf die Stromabschafftheit in Abbildung 43 wird deutlich, dass zwischen diesen beiden Parametern eine positive Korrelation besteht. Konkret bedeutet dies, dass es mit jedem Grad Stromanstieg, also einer Zunahme der Spaltenbildung, auch zu einer Dickenzunahme der AM kommt. Dieser Zusammenhang kann nur bis Grad 4 bestehen, da bei Grad 5 per Definition nahezu kein Stroma mehr vorhanden ist. An Tag 0 und 1 zeigt sich über alle Amnien betrachtet also eine durchschnittliche Dickenzunahme von 2,44 μm beziehungsweise 4,71 μm pro Grad der Strom-

beschaffenheit. Diese Zunahmen sind statistisch nicht signifikant. Im Gegensatz dazu ergeben sich für die Tage 90 und 180 statistisch signifikante Steigungskoeffizienten von $6,31 \mu\text{m}$ beziehungsweise $4,35 \mu\text{m}$.

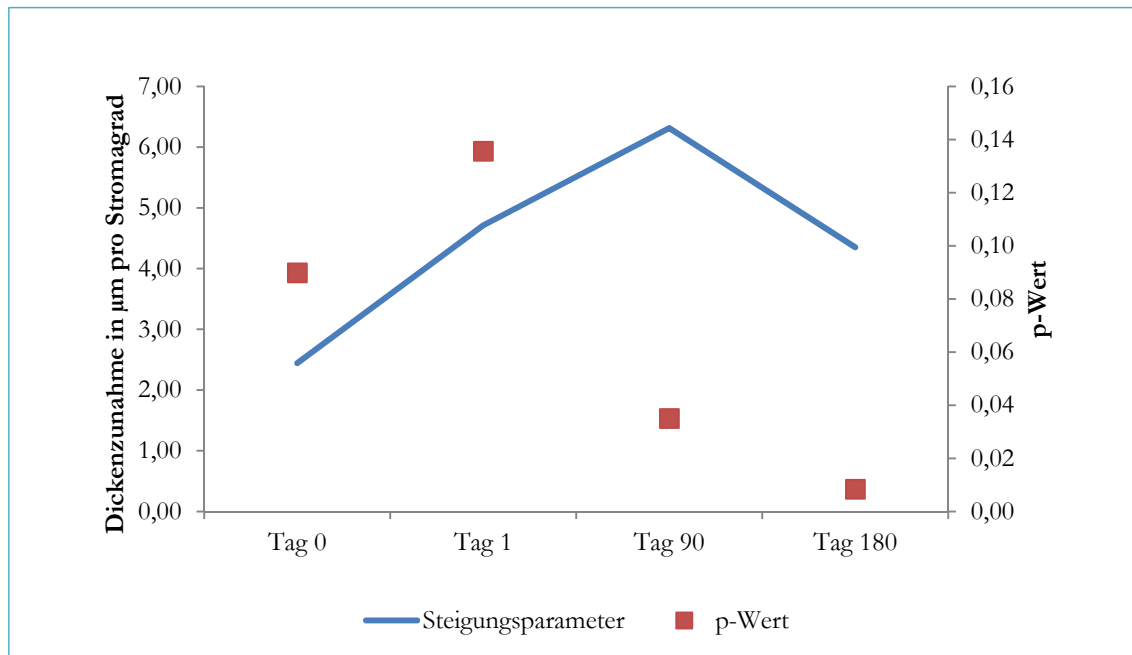


Abbildung 43: Querschnittsregression von der Dicke der Amnionmembranen auf die Stromabeschaffenheit

4.2 Bakteriologische und mykologische Ergebnisse

In der mikrobiologischen Untersuchung der Amnionmembranen zeigen 5/26 Proben an Tag 0 ein positives bakteriologisches Ergebnis. Alle in Tabelle 13 aufgelisteten Bakterien an Tag 0 konnten erst nach Anreicherung nachgewiesen werden. Es handelte sich hierbei um *Brevibacillus parabrevis*, *Sphingomonas paucimobilis*, zweimalig *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus pseudintermedius*. Bei einer von 26 Proben an Tag 1 wurde nach Anreicherung ein Bakterium nachgewiesen. Es handelt sich hierbei um *Staphylococcus warneri*. An Tag 90 wurde bei 2 von 24 Proben eine bakterielle Besiedlung festgestellt. Eine Probe zeigt ein geringgradiges Wachstum von *Staphylococcus hominis*, während es bei der anderen Probe nach Anreicherung zu einem Wachstum von *Streptococcus cristatus* kam. Betrachtet man die Proben an Tag 180 so wurde hier bei 3 von 24 Proben ein positives bakterielles Wachstum festgestellt. Dieses erfolgte bei 2 Proben nach Anreicherung und bei einer Probe nach gängigen Inkubationsbedingungen in geringgradigem Ausmaß. Es handelt sich um folgende Bakterien: *Paenibacillus amylolyticus*, *Staphylococcus warneri* und *Staphylococcus hominis*.

Bei keiner der Proben wurde ein Pilzwachstum festgestellt.

Tabelle 13: Bakteriologisch und mykologische Untersuchung der Amnionmembranen an Tag 0, 1, 90 und 180

Amnion	Tag 0	Tag 1	Tag 90	Tag 180
A2	-	-	Nicht durchgeführt	Nicht durchgeführt
A4	-	-	Nicht durchgeführt	Nicht durchgeführt
B1	Nach Anreicherung <i>Brevibacillus parabrevis</i>	-		Nach Anreicherung <i>Paenibacillus amylolyticus</i>
C1	-	-	-	-
D1	-	Nach Anreicherung <i>Staphylococcus warneri</i>	-	-
D2	-	-	-	-
E1	-	-	-	-
E2	-	-	<i>Staphylococcus hominis</i> (1 Kolonie)	-
E3	-	-	Nach Anreicherung <i>Streptococcus cristatus</i>	-
F1	Nach Anreicherung <i>Sphingomonas paucimobilis</i>	-	-	-
F2	-	-	-	-
H1	-	-	-	-
H2	-	-	-	-
K1	Nach Anreicherung <i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
M1	-	-	-	-
M2	-	-	-	-
T1	-	-	-	-
U1	-	-	-	-
V1	Nach Anreicherung <i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
V2	Nach Anreicherung <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	-	-	-
V3	-	-	-	Geringstgradig <i>Staphylococcus hominis</i>
W1	-	-	-	-
W2	-	-	-	-
W3	-	-	-	Nach Anreicherung Geringgradig <i>Staphylococcus warneri</i>
X1	-	-	-	-
X2	-	-	-	-

5 Diskussion

Die Amnionmembran kommt aufgrund ihres positiven Einflusses auf die Wundheilung (TSENG et al. 1999, YANG et al. 2006, LO und POPE 2009) in der Humanmedizin für zahlreiche Indikationen wie zum Beispiel der Behandlung von Wunden (ANDONOVSKA et al. 2008, FETTEROLF und SNYDER 2012, PAGGIARO et al. 2018) sowie in der rekonstruktiven Chirurgie (GHARIB et al. 1996, KESTING et al. 2014) und Ophthalmologie (ANDERSON 2001, HANADA et al. 2001, DEKARIS und GABRIĆ 2009) zum Einsatz.

In der Veterinärmedizin kommt die AM als biologisches Transplantat vor allem in der Ophthalmologie zur Deckung erworbener kornealer Defekte oder nach Tumorexzision zur Anwendung (OLLIVIER et al. 2006, KALPRAVIDH et al. 2009, PLUMMER et al. 2009, BARACHETTI et al. 2010). Hier wird sowohl equine, porcine, bovine als auch kanine AM in klinischen und/oder experimentellen Studien verwendet (OLLIVIER et al. 2006, TSUZUKI et al. 2008, KALPRAVIDH et al. 2009, KIM et al. 2009). Einschränkend ist allerdings zu sagen, dass nach derzeitigem Kenntnisstand nur sehr wenige Studien speziell zur Anwendung von KAM am Auge und im Speziellen für korneale Erkrankungen existieren (BARROS et al. 2005, KALPRAVIDH et al. 2009). NAM et al. (2013) verwendete die KAM allerdings bereits als Grundlage für die Kultivierung kaniner kornealer Epithelzellen. In der Humanmedizin kommt der Prävention möglicher übertragbarer Erkrankungen durch die AM eine besonders hohe Bedeutung zu.

Um die Sicherheit des Produktes zu gewährleisten, müssen vor dessen Anwendung am Patient Screeningstests des Spenders und der AM selbst durchgeführt werden (DEKARIS und GABRIĆ 2009). Die AM muss also in dieser Zeit gelagert werden können ohne einen deutlichen Qualitätsverlust zu erleiden. Um die Verfügbarkeit der AM zu verbessern, sind möglichst lange Lagerungszeiten ebenfalls vorteilhaft. Mit der Kryokonservierung ist es gelungen eine Methode zu entwickeln, die eine längerfristige Lagerung der humanen AM bis zu zwei Jahren bei gut erhaltener Qualität und Struktur erlaubt (LEE und TSENG 1997, MEHTA et al. 2008, RODRÍGUEZ-ARES et al. 2009, THOMASEN et al. 2011, COOKE et al. 2014).

Ziel der vorliegenden Studie war es die Qualität sowie einen möglichen Qualitätsverlust der KAM über die Zeit der Kryopräservierung mit Hilfe von histologischen und mikrobiellen Kriterien zu ermitteln. Dies stellt eine Vorarbeit zum klinischen Einsatz der KAM als allogenes oder autogenes Transplantat dar. Die histologischen Ergebnisse der Studie konnten zeigen, dass es während und nach der Kryopräservierung eher zu keiner Veränderung der morpho-logischen Charakteristika kommt. Die KAM befand sich allerdings bereits an Tag 0 nach Fixierung und Präparation in einem mäßigen bis teilweise schlechten Zustand.

Die Messung der Dicke ergab eine tendenzielle Abnahme der selbigen über den Zeitraum der Untersuchung, wobei diese nur zwischen Tag 0 und 1 statistisch signifikant war. Die Basalmembran zeigte in der immunhistologischen Untersuchung im der Gesamtschau eine mäßige bis schlechte Abgrenzbarkeit. Dort wo sie sichtbar ist, zeigt sie mehrheitlich eine gute bis mäßige Integrität, die sich über die Zeit der Kryopräservierung und insbesondere am Ende der Lagerungszeit tendenziell leicht verschlechtert. Im Rahmen der mikrobiellen Untersuchung zeigt sich an 11 % der Untersuchungspunkte ein positives bakterielles Wachstum. Dies erscheint zunächst relativ hoch, es handelt sich jedoch mehrheitlich um niederpathogene Erreger.

Die Ergebnisse lassen also die Schlussfolgerung zu, dass die KAM während des Präparationsprozesses einen Qualitätsverlust erfährt und durch die Bearbeitung zu einem histologischen Präparat Artefakte entstehen. Durch den Kryokonservierungsprozess sowie die Lagerung kommt es aber zu keinem weiteren Qualitätsverlust. In zukünftigen klinischen Studien sollten nun die wundheilungsfördernden Eigenschaften der KAM, unter Berücksichtigung der initial scheinbar eher mäßigen Qualität sowie der Fragilität des Produktes, an kornealen Defekten beim Hund untersucht werden.

5.1 Material und Methoden

Die Amnionmembranen wurden, wie es unter klinischen Bedingungen für die Transplantation am Auge nötig ist, unter sterilen Kautelen entnommen. Während der Präparation fiel auf, dass es bereits bei mäßig starkem Druck durch einen feuchten Holztupfer zu Verletzungen des Amnions kommen kann. Mögliche Ursachen hierfür könnten zum einen die geringere Dicke der kaninen AM im Nativzustand sein (siehe unten).

ARCELLI et al. (2009) postulieren, dass eine autologe Transplantation von kaninem Amnion zur Behandlung kornealer Defekte aufgrund der engen Verbindung zum Chorion nicht möglich sei und dieses in der Folge den direkten Kontakt zwischen Amnion und kornealem Stroma verhindere. Diese Aussage trifft allerdings nicht zu, da die Allantois des Fleischfressers das Amnion vollständig umwächst, sodass der Embryo von zwei flüssigkeitsgefüllten Fruchthöhlen umgeben ist. Das Amnion hat also keinen direkten Kontakt zum Chorion (WEHREND 2013). Dennoch kann es bei der Isolierung der AM zu einer Verletzung der selbigen gekommen sein, da es nach der Eröffnung der Fruchthüllen während des Kaiserschnittes zu einem Kollabieren der Fruchthöhlen kommt und so die Schichten aufeinander zu liegen kommen. Bei 22 von 26 Amnien fand mit Sicherheit eine komplette Trennung von der gefäßführenden Allantois statt. In den daraus angefertigten Präparaten zeigte sich ein physiologischerweise avaskuläres Amnionstroma, sodass vom Vorliegen der einzelnen KAM ohne Allantois ausgegangen werden kann. Bei den Präparaten der anderen vier Amnien sind in den immunhistologischen Schnitten vereinzelt Gefäßanschnitte sowie Entzündungszellen zu sehen. Hierbei kann es sich um Gefäße der Allantois, eventuell aber auch um Gefäße, die aufgrund einer Entzündungsreaktion in das Am-

nion eingewandert sind, handeln. Hierbei kommt eine Chorioamnionitis in Frage, bei der es infolge einer in utero Infektion zu einer Infiltration des Chorions, bei einem schwereren Verlauf der Erkrankung aber auch des Amnions, mit neutrophilen Granulozyten kommt (OCHEKE et al. 2016). Während der zugehörigen Kaiserschnitte konnten an den Fruchthüllen sowie dem Fruchtwassers rein makroskopisch allerdings keine pathologischen Veränderungen festgestellt werden, die auf ein entzündliches Geschehen hindeuten.

Nach der Isolierung der KAM wurde diese mit der epithelialen Seite nach oben auf eine Nitrozellulosemembran gespannt. Die Verwendung dieser Membran für die Lagerung von Amnionmembran, welche als Transplantat am Auge genutzt werden soll, wurde bereits von zahlreichen Autoren beschrieben (OLLIVIER et al. 2006, PLUMMER et al. 2009, QURESHI et al. 2010) und kam deshalb auch in der hier vorliegenden Studien zum Einsatz. Da es sich bei der AM um ein sehr dünnes Gewebe handelt, welches zur Faltenbildung neigt, ist eine aufgespannte Lagerung sinnvoll. Des Weiteren ist nur so eine eindeutige Identifizierung der epithelialen/stromalen Seite möglich. Dieser Aspekt ist von therapeutischer Relevanz, da je nach Indikation die epitheliale oder die stromale Seite der AM Kontakt zur Kornea haben sollte (DUA et al. 2004).

In der Humanmedizin wurde bereits vor über 70 Jahren humane AM zur Behandlung von Erkrankungen der Augenoberfläche eingesetzt (ROTH 1940, SORSBY und SYMONS 1946). Durch LEE und TSENG (1997) kam es dann zur Einführung konservierter AM zur Rekonstruktion okulärer Oberflächendefekte und damit zu einer breiten Anwendung auf diesem Gebiet. Eine spezielle Methode zur Haltbarmachung sollte die biologischen Eigenschaften der AM möglichst gut erhalten (KIM und TSENG 1995). Das ursprüngliche Protokoll zur Präservierung der AM zur Anwendung am Kaninchenauge sah eine Lagerung in Glycerin 100 % für eine Woche bei 4 °C vor. Zugunsten einer längeren Lagerungszeit und somit für die Anwendung beim Menschen geeigneter, wurden die Amniontransplantate in Glycerin 50 % bei - 80 °C haltbar gemacht (LEE und TSENG 1997).

Mehrere klinische Studien konnten belegen, dass die kryokonservierte AM sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin ein nützliches Substrat zur Rekonstruktion kornealer Ulzerationen sowie anderer konjunktivaler Defekte ist (TSENG et al. 1997, KRUSE et al. 1999, KRUSE et al. 2000, ARCELLI et al. 2009, PLUMMER et al. 2009). Des Weiteren kommt sie beim Mensch zur Therapie der limbalen Stammzelldefizienz sowie des Symplepharons erfolgreich zum Einsatz (TSENG et al. 1997, TSENG 1998, SABATER und PEREZ 2017). Aufgrund der breitgefächerten und erfolgreichen Anwendung der kryokonservierten AM zur Therapie okulärer Erkrankungen wurden in dieser Studie die Auswirkungen dieser Konservierungsmethode auf die kanine AM untersucht. Andere mögliche Konservierungs- und Sterilisationsmöglichkeiten sind die Lyophilisierung (Gefriertrocknung), die Dehydratation durch Luft, die Haltbarmachung mit Peroxyessigsäure und die Bestrahlung mit γ -Strahlen sowie Kombinationen aus den genannten Verfahren. Die Studie von VERSEN-HÖYNCK et al. (2004b) untersuchte die Einflüsse verschiedener Sterilisati-

ons- und Konservierungsmethoden auf die histologischen Eigenschaften sowie die Dicke der AM. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass es bei der Sterilisation der AM durch Bestrahlung zu deutlichen strukturellen Veränderungen des Gewebes kommt. Dabei zeigte das Epithel deutliche Degenerationsanzeichen sowie weite Interzellularräume zwischen den Epithel-zellen. Auch das Stroma zeigte deutliche Veränderungen in Form von Spaltraumbildung zwischen den Kollagenfaserbündeln. Die Integrität der Basalmembran blieb jedoch, wie bei allen anderen Verfahren auch, erhalten. Das Amnionepithel war nach der Haltbarmachung durch Gefrieren bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, durch Lufttrocknung, in Glycerin 98 % bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ sowie in der Gruppe der Peroxyessigsäure sterilisierten und luftgetrockneten Präparate am besten erhalten. Der signifikanteste Unterschied bezüglich der Dicke der Amnien bestand zwischen den luft- oder gefriergetrockneten Amnien (1) und den Amnien, die in Glycerin bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden (2). Die Amnien 1 zeigten mit einer durchschnittlichen Dicke von $20\text{-}30\text{ }\mu\text{m}$ signifikant niedrigere Werte als die Amnien 2. Diese zeigten durchschnittliche Werte von $45\text{-}50\text{ }\mu\text{m}$.

In der vorliegenden Studie fiel die Wahl eines Kryoprotektivums also auf das Glycerin. Dieses enthält keine Elektrolyte, sodass es zu einem osmotischen Gefälle zwischen Intra- und Extrazellularraum kommt. Es kommt also zu einem Efflux von Elektrolyten aus der Zelle heraus. Gleichzeitig ist die Zellmembran aber permeabel für Glycerin. So gelangt es ins Zellinnere, sodass eine Zellschrumpfung nicht stattfindet. Durch die niedrige Elektrolytkonzentration in der Zelle wird eine Eiskristallbildung und eine damit verbundene Schädigung der selbigen minimiert (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS- BASIC PRINCIPLES OF CRYOPRESERVATION). In der vorliegenden Studie haben wir uns aufgrund der auffallenden Feinheit und Fragilität während der Präparation für die Verwendung von Glycerin entschieden, da es bei der Lagerung in diesem Medium offensichtlich nur zu einer geringen Reduktion der Dicke kommt. Kritisch ist allerdings zu bemerken, dass es durch die hydrophilen Eigenschaften von Glycerin zu einem Einstrom von Wasser und somit zu einer Schwellung des Gewebes und damit zu einer falsch hohen Dicke der AM kommen kann (VERSEN-HÖYNCK et al. 2004b). Die Autoren geben weiterhin zu bedenken, dass die erwähnten Unterschiede der Dicke der Amnien zwischen den unterschiedlichen Sterilisations- und Konservierungsmethoden möglicherweise auch durch die physiologische Schwankungsbreite, wie durch BOURNE (1960) bereits erwähnt, zu erklären sind.

In Bezug auf die strukturellen sowie biologischen Eigenschaften der AM kommen mehrere Studien zu dem Ergebnis, dass diese durch die Kryopräservierung in Glycerin kaum oder überhaupt nicht beeinträchtigt werden. So kamen COOKE et al. (2014) zu dem Schluss, dass die extrazelluläre Matrix der AM durch die Kryopräservierung keinen Schaden nimmt, während es bei einer Dehydratation zu einer Verdichtung des Gewebes sowie zu einer Veränderung der strukturellen Matrixkomponenten kommt. Des Weiteren konnte eine wichtige Matrixkomponente, das HC-HA/PTX3-Molekül, in der dehydrierten AM im Gegensatz zur kryokonservierten Form nicht mehr nachgewiesen werden. Dieses Molekül

besteht aus einer hochmolekularen Hyaluronsäure (HC-HA) und einem Protein (PTX3), welche im Komplex *in vitro* zu einer Hemmung der Proliferation sowie zu einer Steigerung der Apoptose von Lipopolysaccharid- induzierten Makrophagen führen. Durch die Regulation verschiedener Zytokine wie zum Beispiel der Downregulation von IL-12 hat es antiinflammatorische sowie narbenreduzierende Eigenschaften. In der dehydrierten AM fanden die Autoren lediglich niedermolekulare Hyaluronsäure, welche eher eine proinflammatorische sowie immunstimulierende Wirkung hat. Die HC-HA hingegen gilt als die Isoform der Hyaluronsäure, die für die oben benannten therapeutischen Eigenschaften der AM verantwortlich ist. Eine weitere Studie von WAGNER et al. (2018) vergleicht die Kryopräservierung von Amnien mit und ohne Glycerin. Die Amnien in Glycerin zeigten eine bessere Zellvitalität und eine höhere Sekretion des Fibroblastenwachstumsfaktors (bFGF) nach dreimonatiger Lagerungszeit. Nach sechs Monaten konnte in diesen beiden Punkten allerdings kein Unterschied mehr festgestellt werden. Es gab auch keine signifikanten Unterschiede bezüglich der epithelialen oder der stromalen Struktur. Auch die Reißfestigkeit des Gewebes zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Lagerungsgruppen.

Des Weiteren existieren ebenfalls vergleichende Untersuchungen zwischen der bereits lange etablierten Kryopräservierung und der Lyophilisation. So beschäftigten sich unter anderem ALLEN et al. (2013) mit dieser Thematik, da die gefriergetrocknete AM der kryokonservierten AM aus logistischen Gründen überlegen ist, und kamen zu dem Schluss, dass Amnien welche vor der Lyophilisation mit einer schützenden Substanz wie Trehalose oder Raffinose behandelt wurden bessere strukturelle Eigenschaften, ähnlich der nativen AM, aufwiesen als kryopräservierte und gefriergetrocknete Amnien ohne Lyoprotektivum.

Man kann also festhalten, dass momentan mehrere mögliche Protokolle zur Aufbewahrung und Konservierung von Amnion existieren (HENNERBICHLER et al. 2007, WOLBANK et al. 2009), zur Zeit aber die Lagerung in Glycerin und einem Zellkulturmedium wie DMEM in einem Verhältnis von 1:1 bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, wie von LEE und TSENG (1997) beschrieben, am häufigsten Anwendung findet. Aufgrund dessen dient diese Art der Aufbewahrung auch als Grundlage für die hier vorliegenden Untersuchungen. Eine neuere Studie von HETTIARACHCHI et al. (2016) zeigt zwar, dass die Lagerung der AM bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 1:1 DMEM/Glycerin oder 1:1 DMSO/FBS die Struktur der AM besser erhält als die Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in beiden Medien, die Lagerungszeit aber bei dieser Untersuchung nur 6 Wochen betrug. So kamen die Autoren zu dem Ergebnis, dass eine Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eher zum Ablösen des Epithels und zu einer verminderten Zellvitalität führt. Im Gegensatz dazu blieb während der Lagerung der AM bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ sowohl die Zellvitalität als auch die Membranintegrität erhalten. Zum Erreichen solch tiefer Minustemperaturen wird in aller Regel flüssiger Stickstoff verwendet (MAZUR 1984). Dieser muss regelmäßig aufgefüllt werden, was die Lagerung etwas aufwendiger macht.

In der vorliegenden Studie wurden, basierend auf den Informationen in vorhandenen, überwiegend humanmedizinischen Studien, die morphologischen Merkmale, die Dicke der Amnionmembranen sowie deren mikrobiologische Eigenschaften an 4 unterschiedlichen Zeitpunkten beurteilt.

An Tag 0 wurden die Proben in ihrem frischen Zustand beurteilt. Er dient also als Vergleichstag zu den Untersuchungen der kryokonservierten Amnien an Tag 1, 90 und 180. Auch RODRÍGUEZ-ARES et al. (2009) ziehen die native AM als Ausgangspunkt ihrer Untersuchungen heran. Dort diente die unkonservierte AM als Kontrollmaterial für die vergleichende Untersuchung zwischen den Konservierungsmethoden Kryopräservierung in Glycerin und Gefriertrocknung. Auch TAN et al. (2014) zogen die native AM heran um deren strukturelle und biologische Eigenschaften mit denen der kryokonservierten AM zu vergleichen.

An Tag 1 der hier vorliegenden Untersuchungen sollte der Einfluss des Einfrierprozesses auf die Qualität der Proben beurteilt werden. Bei einem zu langsamen Gefrierprozess kommt es durch einen länger andauernden Elektrolytefflux zu einer Dehydratation und damit Schrumpfung der Zelle. Bei einem zu schnellen Einfrieren von Zellen hingegen, werden diese durch intrazelluläre Eiskristallbildung geschädigt (MAZUR et al. 1972). Beide Mechanismen werden wie oben beschrieben durch das Kryoprotektivum Glycerin theoretisch außer Kraft gesetzt und die Zellen damit vor den negativen Einflüssen des Gefrierprozesses geschützt. Trotzdem sollte dieser Aspekt in der vorliegenden Studie nicht unberücksichtigt bleiben, da es sich bei der KAM um ein sehr fragiles Gewebe handelt und es möglicherweise doch zu Schäden an Bestandteilen, die für eine erfolgreiche Transplantation wichtig sind, kommen kann.

Die Tage 90 und 180 in dieser Studie dienen der Untersuchung der Qualität der Amnionproben nach einer längeren Zeit der Kryokonservierung. Der letzte gewählten Zeitpunkt (Tag 180) orientiert sich an dem üblichen Lagerungszeitraum der AM in der Humanmedizin vor deren Anwendung als Transplantat. So kommt die AM dort in der Regel erst nach sechs Monaten, also nach Erhalt aller serologischen Ergebnisse des Spenders sowie der Einhaltung eines sicheren Zeitraums für das Auftreten möglicher übertragbarer viraler Erkrankungen, am Patient zum Einsatz (ADDS et al. 2001, FÜST et al. 2012, JIRSOVA und JONES 2017). In der hier vorgelegten Arbeit wurde zusätzlich nach drei Monaten eine Untersuchung der KAM durchgeführt um einen möglichen Unterschied zwischen drei und sechs Monaten Lagerungszeit feststellen zu können. Einige Veröffentlichungen aus der Humanmedizin geben nämlich mitunter auch andere Zeiträume von drei bis vier Monaten bis zur klinischen Anwendung der AM an (MA 2000, QURESHI et al. 2010). Auf diesen Angaben basieren höchstwahrscheinlich die Studien, welche sich mit dem Einfluss der unterschiedlichen Lagerungszeiträume auf die histologischen/immunhistologischen, biologischen, ultrastrukturellen sowie mikrobiologischen Eigenschaften der AM beschäftigen. So untersuchten WAGNER et al. (2018) die histologischen und mechanischen Eigenschaften

der HAM sowie deren Zellvitalität und die Sekretion des basic fibroblast growth factors (bFGF) nach einem Monat sowie nach drei und sechs Monaten während der Kryokonservierung mit und ohne Glycerin. Eine weitere Untersuchung von LIU et al. (2015) vergleicht zwei Kryokonservierungsmethoden im Hinblick auf deren Einfluss auf die Ultrastruktur unter einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) sowie die Zellvitalität nach drei und sechs Monaten. Auch SINGH et al. (2003) untersuchen die HAM nach drei und sechs Monaten. Dort wurden die biologischen und mikrobiologischen Eigenschaften von luftgetrockneter/bestrahlter AM bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen miteinander verglichen.

Für die histologische sowie immunhistologische Beurteilung wurden die Amnionproben zunächst in 4 %iger Formaldehydlösung fixiert, da diese Form der Fixierung von Geweben in der Histologie die gängige Standardmethode darstellt (OZKAN et al. 2012, MULISCH und WELSCH 2015). Die immunhistologische Färbung von formalinfixierten Schnitten stellt zwar eine Herausforderung dar, da es während des Fixierungsprozesses zu einer Quervernetzung (cross-linking) zwischen Proteinen beziehungsweise Proteinen und Aminosäuren und dadurch zu einer Maskierung der Epitope kommt (ANSON und EDSALL 1945, WERNER et al. 2000). Diese kann allerdings durch Verfahren wie Hitze- oder Proteasebehandlung wieder rückgängig gemacht werden, sodass der eingesetzte Antikörper an das gesuchte Epitop binden kann (BATTIFFORA 1991, WASIELEWSKI et al. 1994). Die Länge der Fixierung der Proben sollte 48 Stunden nicht deutlich überschreiten, da es durch den daraus folgenden Anstieg der Quervernetzungen und teilweise irreversiblen Schäden an den Epitopen zu einer wenig spezifischen Färbung kommen kann. Durch den Einsatz von höheren Antikörperkonzentrationen, längeren Inkubationszeiten des Antikörpers und/oder Signalamplifikation können zwar noch einige Epitope sichtbar gemacht werden, die Hintergrundfärbung nimmt jedoch ebenfalls deutlich zu (WERNER et al. 2000). In der hier vorliegenden Studie wurden die Proben für mindestens 24-72 Stunden fixiert. Ein maximaler Fixationszeitraum wurde nicht definiert, sodass eine Überfixierung bei einigen Proben möglich ist. Die weitere Aufbereitung der Proben hinsichtlich der Antigendemaskierung erfolgte bei allen Proben in gleicher Weise, sodass die teilweise lange Fixierzeit das Färbeergergebnis der betroffenen Proben negativ beeinflusst haben könnte.

Für die Beurteilung der morphologischen Merkmale der KAM wurde in dieser Untersuchung die PAS-Reaktion gewählt, da diese im Vergleich zur H.E.-Färbung eine bessere Darstellung der zu beurteilenden Strukturen, insbesondere der Basalmembran, ermöglichte. Mit der H.E.-Färbung ergaben sich nur unzureichende Färbeergergebnisse, die eine morphologische Beurteilung und folgende Graduierung nicht ermöglichten. Unter Verwendung der PAS-Reaktion hingegen konnte ein gutes Färbeergergebnis erzielt werden und alle Gewebetypen gut voneinander abgegrenzt und bewertet werden. Auch andere Studien verwenden sowohl die H.E.-Färbung als auch die PAS-Reaktion als Standardfärbung zur Beurteilung der AM (VERSEN-HÖYNCK et al. 2004b, RODRÍGUEZ-ARES et al. 2009).

Sowohl in der Human als auch in der Veterinärmedizin wird die PAS-Reaktion zur Darstellung und Beurteilung der Basalmembran unterschiedlicher Gewebetypen genutzt (POLLITT 1996, ARCADI 1997, RODRÍGUEZ-ARES et al. 2009). Bei unseren Untersuchungen ist die Basalmembran mit Hilfe der PAS-Reaktion allerdings nur in einzelnen Proben gut abgrenzbar, weshalb die Kontinuität der Basalmembran in den immunhistologisch gefärbten Präparaten beurteilt wurde.

Zur Darstellung der Basalmembran der KAM wurde hier eine immunhistologische Färbung des Glykoproteins Laminin gewählt, wie es auch in der Studie von (RIAU et al. 2010) an humaner AM durchgeführt wurde. Als Zielprotein wurde Laminin ausgesucht, da es den Hauptbestandteil der nicht-kollagenen Proteine der Basalmembran ausmacht und somit gut für die Beurteilung ihrer Integrität geeignet ist (TAKASHIMA et al. 2008). Des Weiteren beeinflusst Laminin wesentliche zelluläre Aktivitäten wie die Zelladhäsion, -migration, -differenzierung und -proliferation sowie die Apoptose in unterschiedlichen Gewebetypen (AUMAILLEY und SMYTH 1998). So konnten TERRANOVA und LYALL (1986) zeigen, dass es entlang eines Laminingradienten zu einer Migration gingivaler Epithelzellen kommt. Des Weiteren kamen die Autoren dieser Studie zu dem Ergebnis, dass Laminin auch das gingivale Epithelzellwachstum fördert. In Epithelien wie der Haut und der Kornea ist Laminin-5, eine der zahlreichen Isoformen, die dominierende Komponente. Sie fördert dort vor allem die rasche Keratozytenmigration bei bestehenden epithelialen Defekten (KARIYA et al. 2004, IORIO et al. 2015). CIRMAN et al. (2014) beschreiben ebenfalls die chemotaktischen Eigenschaften von Laminin auf epitheliale Zellen und die daraus resultierende Substratwirkung für die Epithelisierung.

Daraus kann man schließen, dass die Anwesenheit von Laminin für die Reepithelisierung von Wunden und somit auch von kornealen Defekten eine entscheidende Rolle spielt. Laminin spielt laut OHJI et al. (1993) auch für die Adhäsion kornealer Epithelzellen eine entscheidende Rolle. Bei dieser Studie handelte es sich um ein in vitro Experiment mit humanen kornealen Epithelzellen. Diese zeigten eine bessere Adhäsion an Laminin als an Fibronectin, welches ebenfalls ein wichtiges Glykoprotein der Basalmembran ist. Korneale Epithelzellen vom Kaninchen zeigen allerdings ein bessere Adhäsion an Fibronectin als an Laminin (KAMERON et al. 1988). Diese unterschiedliche Affinität zu den jeweiligen Komponenten der BM ist möglicherweise auf speziesspezifische Unterschiede der kornealen Epithelzellen zurück zuführen (OHJI et al. 1993). Über die Adhäsion kaniner kornealer Epithelzellen an Laminin existieren nach jetzigem Kenntnisstand keine belastbaren Daten. Allerdings kann Laminin, wie die Arbeit von BENTLEY et al. (2001) zeigt, gut als Markerprotein für die immunhistochemische Darstellung der BM des kaninen Korneaepithels genutzt werden. Auch LABELLE et al. (2012) konnten bei der immunhistologischen Untersuchung physiologischer Hundeaugen Laminin in der Basalmembran des kornealen Epithels nachweisen. Des Weiteren war eine erfolgreiche Darstellung der Basalmembran humaner AM durch eine immunhistologische Färbung von Laminin möglich (RIAU et al. 2010). FUKUDA et al. (1999) wiesen in ihrer Studie Laminin-1 und 5 sowohl in der Ba-

salmembran humaner Cornea, Konjunktiva sowie humaner Amnionmembran nach, sodass aufgrund dieser strukturellen Ähnlichkeit sowie der oben beschriebenen Eigenschaften des Laminin eine Untersuchung der Basalmembran der kaninen AM mit Hilfe dieses Strukturproteins sinnvoll erscheint.

5.2 Ergebnisse der Dickenmessung der AM

Die Untersuchung der Dicke der KAM in der vorliegenden Arbeit zeigt, dass über alle Amnien betrachtet die Dicke über die Zeit der Kryopräservierung im Median um $0,69 \mu\text{m}$ pro untersuchtem Zeitfenster sinkt. Dieses Ergebnis kann allerdings nur als eine Tendenz betrachtet werden. Für eine genaue Angabe in Bezug auf eine Dickenänderung über den Zeitraum der Untersuchung hätten deutlich mehr Untersuchungszeitpunkte gewählt werden müssen. So wäre eine tägliche Untersuchung der Dicke von Tag 0 bis Tag 180 nötig gewesen um ein exaktes Ergebnis zu erhalten. Bei der vergleichenden Untersuchung der Medianwerte der Dicke an Tag 0, 1, 90 und 180 mit Hilfe der Mediantests ist nur der Unterschied zwischen Tag 0 und 1 statistisch signifikant ($p = 0,03$). Diesem Ergebnis entsprechend kommt es also in diesem Zeitraum zu einer signifikanten Abnahme der Dicke der KAM.

Einige Studien, die sich mit dem Einfluss der Kryopräservierung auf die Dicke der Amnionmembran beschäftigen zeigen, dass diese Art der Lagerung eher keinen Einfluss auf diesen Parameter hat. So verglichen beispielsweise WAGNER et al. (2018) den Einfluss der Kryopräservierung mit und ohne Glycerin unter anderem auf die Dicke der humanen AM zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 0,5, 1, 3 und 6 Monaten). Es ergaben sich dort keine statistisch signifikanten Unterschiede weder zu einem der genannten Untersuchungszeitpunkte noch in Bezug auf die zwei angewendeten Lagerungsmethoden. Es ließ sich dort auch kein signifikanter Unterschied zwischen den frischen und den kryokonservierten HAMs feststellen. Auch KRUSE et al. (2000) konnten bezüglich der Dicke keinen Unterschied zwischen frischer und kryokonservierter HAM beobachten. Diese Ergebnisse stehen in einem gewissen Widerspruch zu den Resultaten der hier vorliegenden Arbeit, da es hier initial zu einer signifikanten Dickenabnahme kommt. Ein möglicher Grund hierfür ist der Einfrierprozess, welcher hier lediglich durch das Überführen der KAM von Raumtemperatur in eine Gefriereinrichtung mit $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ vollzogen wurde. Hierbei könnte es durch ein zu langsames Einfrieren und der damit einhergehenden Dehydrierung der Zelle zu einer Zellschrumpfung und damit zu einer Dickenabnahme des Gewebes gekommen sein. Diese Art des Kryoschadens wurde unter anderem von MERYMAN et al. (1977) beschrieben. Allerdings hatte das Glycerin so länger Zeit in die Zelle einzudringen und diese vor den negativen Einflüssen des Gefrierprozesses zu schützen. Die Tatsache, dass es bei den hier durchgeführten Untersuchungen nach Tag 1 zu keiner weiteren signifikanten Dickenabnahme kommt, lässt aber vermuten, dass es sich hier trotzdem um einen derartigen Schaden als Ursache für die Dickenabnahme handeln könnte. Um dieser Frage weiter

nachzugehen, müsste man in weiteren Untersuchung den Einfrierprozess modifizieren indem man eine sehr schnelle Einfriergeschwindigkeit wählt. Dieses Verfahren nennt sich Vitrifikation, bei dem es ohne beziehungsweise nur unter Bildung sehr kleiner Kristalle zu einem sofortigen Erstarren des intra- und extrazellulären Wassers zu Eis kommt. Die Einfriergeschwindigkeit beträgt hier über 50.000 °C/Minute. Um diese zu erreichen werden die Gewebe nach der Überführung in eine hoch konzentrierte Gefrierschutzmittellösung in flüssigen Stickstoff gegeben (MAZUR und SEKI 2011). Die Nachteile dieser Methode sind Spannungen im Gewebe, welche durch ein zu schnelles Einfrieren entstehen und beim Auftauprozess zu Schädigungen der Zellen führen können. Des Weiteren werden hier hohe Konzentrationen des Kryoprotektivums, die zelltoxisch wirken, benötigt.

In Bezug auf die Dicke der nativen AM sind tierartige Unterschiede zu erkennen. In der hier vorgelegten Arbeit beträgt die Dicke aller AMs an Tag 0 im Median 12,77 µm (7,6-40,08 µm). Für die humane AM werden Werte von 20-500 µm angegeben (BOURNE 1960, HAHN et al. 2010). Für equine, porcine und ovine AM existiert eine vergleichende Studie der fetalen Membranen (BORAZJANI et al. 2011). Allerdings wurden hier die Allantoamnien (AAs) und nicht nur die AM miteinander verglichen. Dort wurden Dicken von $758,2 \pm 385,4$ µm für das equine AA, $71,1 \mu\text{m} \pm 32,3$ für das porcine AA und $74,7 \mu\text{m} \pm 45$ für das ovine AA festgestellt. Hieraus wird ersichtlich, dass sich auch abzüglich der Dicke der Allantois bei diesen Spezies wahrscheinlich höhere Dicken der AM ergeben als für die KAM.

5.3 Ergebnisse der Basalmembranbeurteilung (Immunhistologische Untersuchung)

Die immunhistologische Untersuchung der Basalmembran der KAM zeigt, dass die Abgrenzbarkeit der Proben an Tag 0, 1 und 180 im Median jeweils nur mäßig ist. An Tag 90 ist diese im Median mäßig bis schlecht. Betrachtet man alle Amnien über den gesamten Zeitraum der Kryopräservierung, so kommt es im Median zu keiner Änderung der Abgrenzbarkeit pro untersuchtem Zeitfenster. Dieses Ergebnis stellt ebenfalls nur eine Tendenz dar. Für eine genauere Analyse hätten deutlich mehr Untersuchungszeitpunkte gewählt werden müssen. Das Ergebnis der Trendregression über alle Amnien wird jedoch durch das Ergebnis der vergleichenden Untersuchung der Medianwerte der Abgrenzbarkeit an Tag 0, 1, 90 und 180 mit Hilfe der Medianvergleichstests unterstützt. Im Median lässt sich hier kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Tagen 0 und 1, 1 und 90, 90 und 180 sowie 0 und 180 feststellen.

Bei näherer Betrachtung fällt auf, dass die meisten der mit null bewerteten Präparate einen schlechten bis sehr schlechten Epithelzustand aufweisen. Insgesamt wurde an 32 Untersuchungszeitpunkten die Abgrenzbarkeit der BM mit null bewertet. Davon zeigten 18 Proben eine Epithelbeschaffenheit der Kategorie 5, zehn eine der Kategorie 4, eine die Kategorie 3 und drei eine der Kategorie 2. Das legt den Schluss nahe, dass ein schlecht erhalte-

nes Epithel mit einer ebenso stark veränderten Basalmembran in Zusammenhang stehen könnte. Einschränkend ist zu erwähnen, dass die Beschaffenheit des Epithels in der hier vorgelegten Arbeit nur anhand der PAS- Reaktion beurteilt wurde. Mögliche Schäden, die während der Anfertigung der immunhistologischen Schnitte entstanden sein könnten, wurden hier nicht berücksichtigt. In einigen Proben wie in Abbildung 25 gezeigt, ist der Ablösevorgang des Epithels samt der Basalmembran gut zusehen. Im Gegensatz dazu ist in Abbildung 26 nur die Ablösung des Epithels erkennbar. Die Basalmembran ist hier weiterhin erhalten. Hier ist also zu bedenken, dass es sich bei dem Ablösevorgang des Epithels, ob mit oder ohne Basalmembran, auch um einen präparationsbedingten Schaden oder ein histologisches Artefakt handeln könnte. Es bleibt also weiter fraglich, ob hier ein realer Zusammenhang zwischen Epithel- und Basalmembranalteration besteht.

In der Studie von HETTIARACHCHI et al. (2016) kam es bei der HAM, welche in DMEM und Glycerin (1:1) bei - 80 °C gelagert wurde vermehrt zur Ablösung des Epithels. Die Basalmembran blieb dort allerdings unbeschädigt. Auch WILSHAW et al. (2006) konnten durch einen immunhistologischen Nachweis mehrerer Komponenten der BM zeigen, dass diese trotz gewollter Dezellularisierung intakt blieb. Es bleibt also weiter fraglich, ob die Ergebnisse dieser Arbeit einen realen Zusammenhang zwischen Epithel- und Basalmembranalteration aufzeigen.

Bei 5 der 32 Präparate mit einer nicht abgrenzbaren BM fällt eine deutliche Hintergrundfärbung auf. So ist hier teilweise das Epithel und/oder der Mikrovillisaum sowie das Trägermaterial (die Nitrozellulosemembran) deutlich mit angefärbt. Dieser Umstand macht eine Unterscheidung der BM von den umliegenden Strukturen hier unmöglich. Die teilweise starke Hintergrundfärbung kann durch die Verwendung eines polyklonalen Antikörpers mit bedingt sein. Polyklonale Seren enthalten neben den antigenspezifischen Antikörpern meist auch unspezifisch bindende Klone (HAUK 2014). Diese führen zu einer Bindung von nicht gesuchten Antigenen und damit zu einer Anfärbung unerwünschter Bereiche im immunhistologischen Schnitt. Der Vorteil eines polyklonalen Antikörpers besteht in der Detektion mehrerer Epitope eines Antigens. Sollten manche Epitope beschädigt oder maskiert sein, ist eine Kompensation durch eine Antigenerkennung an vielen anderen Stellen möglich. Weitere Gründe für eine vermehrte Hintergrundfärbung können die Austrocknung der Präparate, zu hohe Konzentration des Primärantikörpers, eine unvollständige Entparaffinierung, Proteinkontamination in Wasserbädern sowie eine verzögerte Fixierung sein (LANG 2013, Kapitel 12: Immunhistochemie). Diese Faktoren können hier eher ausgeschlossen werden, da die Schnitte alle durch eine sehr erfahrene medizinisch technische Fachangestellte des Instituts für Pathologie der veterinärmedizinischen Fakultät sowie nach einem etablierten Protokoll angefertigt wurden. Der Antikörper sowie dessen gewählte Konzentration wurden zuvor durch eine Positivkontrolle getestet.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Kontinuität der BM zeigen im Median an Tag 0 neun, an Tag 1 elf, an Tag 90 acht und an Tag 180 elf Unterbrechungen pro 2000 µm

untersuchter Strecke. Die daraus abgeleiteten Scorewerte sind also 1, 2, 1, 2 für Tag 0, 1, 90 und 180. Betrachtet man alle Amnien über den gesamten Zeitraum der Kryopräservierung, so steigt die Anzahl der Unterbrechungen der BM im Median um 0,07 Scoreeinheiten pro untersuchtem Zeitfenster. Sie nimmt also im Median von Tag 0 zu Tag 1, von Tag 1 zu Tag 90 sowie von Tag 90 zu 180 um 0,07 Score- Einheiten zu. Dies entspricht grob einem Zahlenwert von 0,3 Unterbrechungen. Auch hier handelt es sich um eine Trendregression, die durch die geringe Zahl der Beobachtungszeitpunkte nur eine Tendenz wieder gibt. Betrachten man die Ergebnisse der Medianvergleichstest zwischen den Tagen 0 und 1, 1 und 90, 90 und 180 sowie 0 und 180 konnte hier zwar kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden, zwischen Tag 90 und 180 nähert sich der p-Wert (0,07) aber dem festgelegten Signifikanzniveau an. Eine höhere Stichprobengröße hätte hier möglicherweise zu einem statistisch signifikanten Ergebnis geführt. Der leicht positive Trendparameter sowie die Beobachtung zwischen Tag 90 und 180 lassen die Annahme zu, dass sich die Struktur und damit die Integrität der BM der KAM über die Zeit der Kryopräservierung verschlechtert hat.

Insbesondere am Ende der Lagerungszeit scheint es zu einem Qualitätsverlust zu kommen. Ob diese Beobachtungen eine klinische Relevanz haben, muss durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden. Prinzipiell wird der BM und deren Integrität in Bezug auf die Reepithelisierung kornealer Defekte aber eine wichtige Rolle zugeschrieben. So ähnelt die Zusammensetzung der Basalmembran der AM der Konjunktiva und Kornea (FUKUDA et al. 1999), sodass diese ein wichtiges Substrat für die Einwanderung kornealer Epithelzellen darstellt (JIRSOVA und JONES 2017). Auch IRANPOUR et al. (2018) zeigen die Relevanz der BM für die Reepithelisierung auf. Sie verglichen in ihrer Studie die drei Schichten der humanen Amnionmembran bezüglich ihrer Verwendbarkeit als Transportmedium für die Transplantation autogener oder allogener Zellen und kamen zu dem Ergebnis, dass die AM mit intakter Basalmembran ohne Epithel der AM mit Epithel sowie dem Stroma in punkto Adhäsion und Proliferation aufgebracht Keratinozyten und stromalen Zellen aus Fettgewebe überlegen war. Es existieren zwar auch Berichte, die eine Epithelzellproliferation auf dem Stroma der AM belegen (SEITZ et al. 2006), der Großteil der Literatur setzt allerdings eine intakte BM mit oder ohne Epithel für einen erfolgreiche Reepithelisierung kornealer Defekte voraus (HU et al. 2003, RESCH et al. 2006).

5.4 Ergebnisse der morphologischen Untersuchung der AM

In Bezug auf die Epithelmorphologie fallen die Proben der Tage 0, 1, 90 und 180 im Median in die Kategorie 4. Mehr als die Hälfte der Epithelzellen zeigen hier Anzeichen einer Degeneration oder haben den Kontakt zur BM beziehungsweise dem Stroma verloren. Bereits anhand dieser Zahlen lässt sich erahnen, dass es zwischen den Untersuchungszeitpunkten keine bedeutenden Unterschiede gibt, die Epithelqualität sich also während der Zeit der Kryopräservierung nicht maßgeblich verändert. Diese Annahme wird

durch die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchung der Medianwerte der Epithelmorphologie an Tag 0, 1, 90 und 180 mit Hilfe der Medianvergleichstests weiter unterstützt. Hier ergaben sich im Median keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Tagen 0 und 1, 1 und 90, 90 und 180 sowie 0 und 180. Vielmehr wird ersichtlich, dass das Epithel sich bereits nativ vielfach in einem mäßigen bis schlechten Zustand befindet und dieser über den Zeitraum der Untersuchung nahezu konstant bleibt. Dies wird auch durch die durchgeführte Trendregression untermauert. Diese zeigt auch hier aufgrund der zu kleinen Anzahl von Untersuchungszeitpunkten nur eine Tendenz an. Es ist aber zu erkennen, dass es über alle Amnien betrachtet im Median zu keiner Veränderung der Epithelmorphologie der AM pro untersuchtem Zeitfenster kommt.

Auch THOMASEN et al. (2011) kamen zu dem Ergebnis, dass es durch eine Kryokonservierung der AM in DMEM und Glycerin (1:1) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ über einen langen Zeitraum zu keiner nennenswerten Veränderung der Epithelmorphologie kommt. Untersucht wurde hier humane AM über eine Zeitspanne von 24 Monaten. Einschränkend ist allerdings zu sagen, dass im Vergleich zu den hier vorliegenden Ergebnissen die Epithelbeschaffenheit in der Studie von THOMASEN et al. (2011) deutlich besser war. Es zeigte sich dort zum Beispiel an keinem Präparat eine Ablösung des Epithels, eine genaue Einteilung in Kategorien wurde allerdings nicht vorgenommen. Andere Autoren wie die Gruppe um HETTIARACHCHI et al. (2016) konnten allerdings zeigen, dass es bereits nach 6 Wochen Lagerung der HAM in DMEM und Glycerin (1:1) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu einer Ablösung des Epithels von der BM kam. Im Gegensatz dazu blieben die Epithelien bei einer Lager-temperatur von $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ im gleichen Medium völlig intakt. Der Umstand, dass die physiologische zelluläre Aktivität erst bei $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ völlig zum Erliegen kommt (SCHMITZ 2011), unterstreicht dieses Ergebnis. Wenn die Erhaltung des Epithels also gewünscht ist, und das ist auch die Empfehlung dieses Artikels, sollte die Kryopräservierung der AM möglichst bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt werden.

Ob ein intaktes Epithel für den erfolgreichen klinischen Einsatz am Auge überhaupt notwendig ist, wird in der Literatur allerdings kontrovers diskutiert. Die AM enthält unterschiedliche Wachstumsfaktoren wie den epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor- α (TGF- α), keratinocyte growth factor (KGF), hepatocyte growth factor (HGF), hepatocyte growth factor receptor (HGFR), basic fibroblast growth factor (bFGF) sowie den transforming growth factor (TGF)-b1 und -b2, welche vor allem von den Epithelzellen gebildet werden (KOIZUMI et al. 2000, LI et al. 2005, GICQUEL et al. 2009). Diese Wachstumsfaktoren tragen laut RIAU et al. (2010) zur kornealen Reepithelialisierung sowie der Reduktion der kornealen Entzündung und Narbenbildung bei. Einige Studien zeigen, dass Amnien mit vitalen Zellen bessere antioxidative, chemotaktische sowie antinflammatorische Eigenschaften aufweisen als avitale Amnionmembranen (DUAN-ARNOLD et al. 2015b, DUAN-ARNOLD et al. 2015a). Allerdings kommt es durch die meisten Formen der Präservierung zu einer Devitalisierung eines Großteils oder sogar aller Zellen der AM. So beschreiben KRUSE et al. (2000) in ihrem Aufsatz, dass es durch die

Kryopräservierung der HAM zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Zellvitalität und Proliferationskapazität kommt und die Amnionmembran in ihrer Funktion als Transplantat primär als eine Matrize für die Einwanderung von Zellen und nicht als eine Quelle intakter und funktioneller Zellen angesehen werden sollte. Auch KUBO et al. (2001) konnten zeigen, dass schon nach zweimonatiger Kryopräservierung nur noch 50 % der Zellen vital und teilungsfähig waren und nach 18 Monaten keinerlei lebende Zellen mehr nachgewiesen werden konnten. Im Hinblick auf die einschlägige Literatur halten DUA et al. (2004) fest, dass die Vitalität der Zellen für die biologische Effektivität der AM nicht maßgeblich entscheidend ist. Weiterhin konnten sie ein langsames Einwachsen kornealer Epithelzellen bei erhaltenem Amnionepithel im Vergleich zu deepithelisiertem Amnion feststellen. Man kann also davon ausgehen, dass die hier festgestellte mäßige bis schlechte Epithelmorphologie eher keinen Einfluss auf die klinischen Ergebnisse bei der Behandlung kornealer Defekte mit KAM haben wird, in diesem Punkt jedoch vielmehr die Integrität der Basalmembran und ihre reepithelisierenden Eigenschaften (wie in Kapitel 5.3 beschrieben) eine entscheidende Rolle spielen.

Im Hinblick auf die Stromabeschaffenheit fallen alle Proben der Tage 0, 1, 90 und 180 im Median in die Kategorie 4. Hier zeigt das Stroma auf über der Hälfte der untersuchten Strecke eine Spaltenbildung, ist also eher schlecht erhalten. Dieser im Median gleichbleibende Zustand über die Zeit der Kryopräservierung wird durch die Trendregression über alle Amnien bestätigt. Hier zeigt sich ebenfalls keine Veränderung pro untersuchtem Zeitfenster. Einschränkend ist wieder zu sagen, dass es sich hierbei nur um eine Tendenz handelt. Die vergleichende Untersuchung der Medianwerte der Stromabeschaffenheit an Tag 0, 1, 90 und 180 mit Hilfe der Medianvergleichstests unterstützt jedoch auch die Annahme einer gleichbleibenden Stromabeschaffenheit, da hier im Median zwischen den Tagen 0 und 1, 1 und 90, 90 und 180 sowie 0 und 180 kein statistisch signifikanter Unterschied besteht.

Die vorhandene Literatur beschreibt häufig nur die biologischen Charakteristika des Amnionstromas und weniger die morphologischen Veränderungen während der Kryopräservierung. So beschrieben DEKARIS und GABRIĆ (2009) die therapeutisch wichtigen Eigenschaften des Stromas. Dazu zählen die Reduktion des Einwachsens von fibrovaskulärem Gewebe sowie die Minimierung abnormaler Neovaskularisation während der kornealen Heilung. Des Weiteren unterdrückt die stromale Matrix Lipopolysaccharide. Dies führt zu einer Minderung der Entzündungsreaktion auf der Augenoberfläche und damit zu einer Reduktion der Upregulation der Interleukine 1 α und 1 β sowie der daraus resultierenden Narbenbildung (SOLOMON et al. 2001). Auch DUA et al. (2004) zeigen die antiinflammatorischen Eigenschaften des Stromas der AM auf. Als Indikation für die Orientierung der AM mit der stromalen Seite nach oben nennen die Autoren entzündliche Vorgänge, welche durch die stromale Matrix gehemmt werden. Das Stroma ist in der Lage Entzündungszellen einzufangen und diese der Apoptose zuzuführen. In diesem Fall erfüllt die AM die Aufgabe einer biologischen Wundaufgabe und das Epithel wächst unter der AM ein.

In Bezug auf etwaige morphologische Veränderungen des Stromas konnten KRUSE et al. (2000) keine nennenswerten Unterschiede zwischen frischen und kryokonservierten Amnien feststellen. Es liegt auf der Hand, dass das Stroma durch seine formgebenden Bestandteile wie Kollagen Typ I und III in der Kompaktschicht auch wichtige mechanische Aufgaben übernimmt (PARRY und STRAUSS 1998). Deshalb ist die Erhaltung seiner Integrität von Bedeutung für die Verwendung der KAM als Transplantat oder Wundauflage bei der Therapie kornealer Defekte. Auch das Handling der AM wäre vermutlich durch ein ausgedünntes oder fehlendes Stroma deutlich erschwert, da es sich bei der KAM ohne hin schon um ein sehr fragiles Gewebe handelt.

In dieser Arbeit zeigt das Stroma zwar eine eher schlechte Beschaffenheit, welche durch eine vermehrte Spaltenbildung gekennzeichnet ist, konnte aber in den meisten Fällen nachgewiesen werden. Lediglich bei 8 von 104 Untersuchungszeitpunkten ist nahezu kein Stroma mehr nachweisbar gewesen. Man kann also festhalten, dass es durch die Spaltenbildung möglicherweise zu einer gewissen Verschlechterung der Stabilität und Reißfestigkeit kommt, die Gesamtdicke der AM durch diesen Umstand jedoch wahrscheinlich eher zunimmt. Dieser Zusammenhang wird durch die angefertigte Querschnittsregression der Dicke auf die Stromabeschaffenheit deutlich. Hieraus wird ersichtlich, dass zwischen diesen beiden Parametern eine positive Korrelation besteht. So kommt es mit jedem Grad Stromaanstieg (also einer vermehrten Spaltenbildung) zu einer Dickenzunahme der AM. An Tag 0 und 1 zeigt sich über alle Amnien betrachtet eine durchschnittliche Dickenzunahme von $2,44 \mu\text{m}$ beziehungsweise $4,71 \mu\text{m}$ pro Grad der Stromabeschaffenheit. Diese Zunahmen sind statistisch nicht signifikant. Im Gegensatz dazu ergeben sich für die Tage 90 und 180 statistisch signifikante Steigungskoeffizienten von $6,31 \mu\text{m}$ beziehungsweise $4,35 \mu\text{m}$. Hier kann man folglich anhand der erhobenen Daten einen echten Zusammenhang zwischen der Spaltenbildung in der stromalen Matrix und der Dickenzunahme der KAM annehmen.

Welchen Einfluss die Spaltenbildung selbst beziehungsweise die Korrelation zwischen ihr und der Gesamtdicke der AM auf das klinische Ergebnis nimmt, kann erst durch die Anwendung kryokonservierter KAM an kornealen Läsionen untersucht werden. Durch eine Dickenzunahme der KAM ist ein etwas leichteres Handling während der Transplantation am Auge vorstellbar.

Ähnlich wie die beiden anderen Schichten der KAM, ist auch der Mikrovillisaum in den hier vorliegenden Proben in einem mäßigen bis schlechten Zustand. So befinden sich die Proben der Tage 0, 1 und 180 im Median in der Kategorie 3. Hier ist der Mikrovillisaum schlecht erhalten. Die Proben des Tages 90 zeigen im Median einen mäßig erhaltenen Mikrovillisaum und sind so in die Kategorie 2 einzuordnen. Trotz des etwas besseren Erhalts der Proben an Tag 90 beim einfachen Vergleich der Medianwerte der einzelnen Untersuchungszeitpunkte, zeigt sich anhand der Trendregression über alle Amnien in diesem Punkt im Median eher keine Veränderung pro untersuchtem Zeitfenster. Auch hier

spiegelt die Trendregression lediglich eine Tendenz der Ergebnisse wieder. Jedoch zeigt auch die vergleichende Untersuchung der Medianwerte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Tagen 0 und 1, 1 und 90, 90 und 180 sowie 0 und 180. Der Mikrovillisaum befindet sich also bei den Proben an Tag 0, nach Fixierung und Präparation, bereits in einem eher schlechten Zustand und es kommt in diesem Punkt ebenfalls zu keiner Veränderung im zeitlichen Verlauf der Kryopräservierung.

Der Mikrovillisaum stellt in dieser Arbeit ein vervollständigendes morphologisches Element des Epithels dar und wurde so in die Beurteilung mit einbezogen. Für die erfolgreiche Transplantation der AM bei kornealen Läsionen spielt er aber vermutlich keine bedeutende Rolle, da wie oben beschrieben die meisten Studien der Basalmembran die hauptsächlichsten Eigenschaften, die für die Regeneration der Hornhaut notwendig sind, zuschreiben. Für einige ist zwar auch das Epithel selbst von Bedeutung (siehe auch oben genannte Quellen), der Mikrovillisaum wird jedoch in der einschlägigen Literatur in diesem Zusammenhang nicht genannt.

Die möglichen Ursachen für die bereits im nativen Zustand mäßige bis schlechte Gewebemorphologie der KAM in der hier vorgelegten Arbeit können präparationsbedingt sein, da das Ablösen der KAM von den anderen Fruchthüllen, ohne diese zu verletzen, aufgrund der Fragilität des Objektes eine Herausforderung darstellt und es hier durch die Manipulation möglicherweise bei einigen Proben zu einem Ablösen des Epithels und/oder Einreißen der stromalen Matrix gekommen sein könnte. Eine weitere Grund könnte die relativ niedrige Temperatur von 5 °C während der Fixierung der Proben sein. Da es sich um ein sehr feines Gewebe handelt, haben wir diese Temperatur gewählt, damit die autolytischen Prozesse verlangsamt werden und den Fixierungsprozess nicht überholen. Allerdings wird durch zu niedrige Temperaturen auch das Durchdringverhalten des Formalins gebremst, sodass es im ungünstigsten Fall zu einer unzureichenden Fixierung gekommen ist. Dadurch laufen degenerative post-mortem Prozesse weiter ab und die Integrität des Gewebes bleibt schlecht oder überhaupt nicht erhalten (AUGHEY und FRYE 2001, Kapitel: Indroduction). Jedoch werden durch die niedrigen Temperaturen, wie oben erwähnt, auch die autolytischen Prozesse verlangsamt (LANG 2013, Kapitel Fixierung), sodass trotzdem ein gutes Fixierungsergebnis erreicht wird. In der Molekularbiologie hat sich ebenfalls die Fixierung bei Kühlschranktemperatur etabliert (LANG 2006). Denkbare technische Ursachen für die stromale Spaltenbildung, bedingt durch Gewebebrüche, sind unachtsame Handhabung der Proben beim Trimmen, unsanfte Behandlung während des Entfernens von Falten beim Aufschwimmen, eine zu lange Verweilzeit im Wasserbad oder zu hohe Temperatur des Wasserbads. Eine Spaltenbildung des Stromas ist in der Mehrzahl der Proben nachvollziehbar. Deren Anordnung zeigt, wie unter anderem in Abbildung 35 und 36 dargestellt, stets einen horizontalen Verlauf innerhalb des Stromas sowie in aller Regel ein gleichsinniges Aussehen, sodass eher von einer echten Gewebsalteration als von einem Artefakt ausgegangen werden kann.

5.5 Ergebnisse der bakteriologischen und mykologischen Untersuchung

Die mikrobiologische Untersuchung der Amnionmembranen kommt zu folgendem Ergebnis: Die Proben an 11 von 100 Untersuchungszeitpunkten zeigen ein positives bakterielles Wachstum.

Dabei handelt es sich um 5 Proben an Tag 0, also der nativen KAM. Die nachgewiesenen Bakterien sind *Brevibacillus parabrevis*, *Sphingomonas paucimobilis*, zweimalig *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus pseudintermedius*. Ein Wachstum dieser Spezies fand erst nach Anreicherung statt.

Bei *Brevibacillus parabrevis* handelt sich um ein sporenbildendes Bakterium, welches vor allem in der Außenwelt und dort insbesondere auf Böden und als Saprophyt lebt. Es ist nicht primär pathogen und spielt so klinisch eher keine Rolle (LOGAN ET AL. 2015). Anders verhält es sich bei dem gram negativen Bakterium *Sphingomonas paucimobilis*. Dieses stellt ein ernstzunehmendes Problem in humanmedizinischen Kliniken dar, da es eine der häufigsten Ursachen nosokomialer Infektionen ist. Durch *S. paucimobilis* kann es zu durch kontaminierte Lösungen wie destilliertem Wasser, Dialyselösungen oder sterilen Injektionslösungen zu Bakteriämien/Septikämien kommen. Auch septische Arthritiden und Osteomyelitiden infolge einer Infektion mit diesem Bakterium sind beschrieben (RYAN und ADLEY 2010).

Staphylococcus epidermidis wurde bis 1980 eher als ein rein opportunistischer Keim angesehen. Heute ist er einer der fünf bedeutenden Mikroorganismen, die sich auf menschlichen Haut- und Schleimhautoberflächen befinden und aufgrund der weit verbreiteten Verwendung von medizinischen Implantaten und Geräten nosokomiale Infektionen verursachen können (EIFF et al. 2002). Auch beim Hund wurde *S. epidermidis* bereits auf der Hautoberfläche nachgewiesen (ROSSI et al. 2018), es existieren für diese Spezies allerdings nur vereinzelt experimentelle Studien oder Fallberichte über die biofilmproduzierenden und damit klinisch relevanten Eigenschaften dieses Erregers (PETTY et al. 1985, SWANSON et al. 2014).

Staphylococcus pseudintermedius ist ein Kommensale der Haut sowie der Schleimhäute und konnte bereits aus der Nasen-, Mund-, Pharynx-, Stirn-, Leiste- und Afterregion von gesunden Hunden und Katzen isoliert werden (COX et al. 1985, COX et al. 1988, TALAN et al. 1989, LILENBAUM et al. 1999, RUBIN und CHIRINO-TREJO 2011). Die Analregion und die Nase sind die am häufigsten und stärksten besiedelten Bereiche bei gesunden Hunden (DEVRIESE und PELSMAECKER 1987). *S. pseudintermedius* stellt eine der Hauptursachen für Haut- und Ohrinfektionen sowie Infektionen anderer Körpergewebe und -höhlen dar und ist ebenso häufig an postoperativer Wundinfektionen bei Hunden und Katzen beteiligt. In der Vergangenheit waren *S. pseudintermedius*-Isolate im Allgemeinen

empfindlich gegen Penicillinase-stabile β -Lactam-Antibiotika (MEDLEAU et al. 1986, PELLERIN et al. 1998, WERCKENTHIN et al. 2001, VAN DUIJKEREN et al. 2004). Allerdings haben sich Methicillin-resistente *S. pseudintermedius* Stämme seit 2006 zu einem schwerwiegenden Gesundheitsproblem in der Tiermedizin entwickelt (WEESE und VAN DUIJKEREN 2010).

An Tag 1 der mikrobiologischen Untersuchungen ist nur eine Probe durch ein positives Wachstum aufgefallen. Hierbei handelt es sich um *Staphylococcus warneri*, der wie andere koagulase-negative Staphylokokken selten Erkrankungen verursacht. Allerdings kann es bei immunsupprimierten Patienten zu Infektion kommen (KLOOS und SCHLEIFER 1975). In einer Studie von HAN et al. (2016), die der bakteriologischen Untersuchung der nasalen Schleimhaut von gesunden Hunden und ihren Besitzern diente, ließ sich dieses Bakterium auf der kaninen nasalen Schleimhaut überhaupt nicht nachweisen, während es beim Mensch einmal vorkam. Es scheint also weder als Kommensale noch als pathogener Keim eine große Rolle zu spielen.

Zwei Proben an Tag 90 sind hinsichtlich ihres bakteriellen Wachstums auffällig. Isoliert werden konnten zum einen *Staphylococcus hominis*, zum anderen *Streptococcus cristatus*. *S. hominis* gehört wie *S. warneri* zu den koagulase-negativen Staphylokokken und zeigt ein ähnlich niedriges pathogenes Potential (KLOOS und SCHLEIFER 1975). Die meisten Stämme reagieren zwar sensibel auf die gängigen Antibiotika wie Penicillin, ein Stamm (*S. hominis* subsp. *Novobiosepticus*) sowie diverse Unterstämme von diesem sind resistent gegen viele gängige Antibiotika wie Methicillin, Gentamicin, Clindamycin, Chloramphenicol, Ciprofloxacin um nur einige zu nennen (KLOOS et al. 1998). In dieser Form stellt *S. hominis* für immunsupprimierte Menschen und Tiere eine reale Gefahr dar. *Streptococcus cristatus* gehört zu der Streptokokkengruppe, die in humanen oralen Biofilmen gefunden werden (MOUTON et al. 1980). *S. cristatus* ist dort in der Lage die Biofilmbildung von *Porphyromonas gingivalis*, einem der Hauptverursacher der Parodontitis beim Erwachsenen, zu unterbrechen (WANG et al. 2009). Zu einer primären Pathogenität finden sich in der derzeitigen Literatur keine Hinweise.

Betrachtet man Tag 180, so zeigt sich bei drei Proben ein positives bakterielles Wachstum. Die nachgewiesenen Bakterien sind *Paenibacillus amylolyticus*, *Staphylococcus hominis* und *Staphylococcus warneri*. Einige Spezies der Paenibacillen sind pathogen für Honigbienen und weitere wirbellose Tiere, während andere, als opportunistische Keime, beim Mensch Infektionen verursachen können (GRADY et al. 2016). Die Pathogenität von *Paenibacillus amylolyticus* ist nicht geklärt. *Staphylococcus hominis* und *Staphylococcus warneri* wurden bezüglich ihrer allgemeinen Pathogenität oben im Text bereits besprochen.

Zusammenfassend lässt sich also für die bakteriologischen Ergebnisse sagen, dass von den nachgewiesenen Erregern als potenziell pathogen nur *Sphingomonas paucimobilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus pseudintermedius* und *Staphylococcus hominis* in seiner multiresistenten Form klinisch relevant sind.

Für die Verwendung der KAM am Auge und im Speziellen bei kornealen Läsionen, ist vor allem *Staphylococcus pseudintermedius* von Bedeutung, da es sich hier um eine Staphylokokken-Subspezies handelt, die neben Koagulase auch Enzyme wie Proteasen, Thermo-nuclease und verschiedene Toxine produziert (FITZGERALD 2009). Insbesondere die Proteasen können, durch ihrer proteolytische Aktivität an Kollagen, Proteoglykanen und anderen Komponenten der Stromalen Matrix, bei kornealen Ulzerationen zu einer Verflüssigung (Einschmelzung) des Stromas und damit zu einer Verschlechterung des Zustandes führen, welcher im schlimmsten Fall in einer Perforation der Hornhaut mündet und so zu einem Verlust des Auges führen kann (GELATT 2014, Kapitel: Kanine cornea: Diseases and Surgery). Die Studie von SUTER et al. (2018) beschäftigt sich mit der septischen Keratitis bei Hunden, Katzen und Pferden in der Schweiz sowie den beteiligten Bakterien und deren Antibiotikaempfindlichkeiten. Dort wurden beim Hund am häufigsten Staphylokokken nachgewiesen. Die häufigste isolierte Subspezies war *Staphylococcus pseudintermedius*. Auch LIN und PETERSEN-JONES (2007) kamen bei der bakteriellen Untersuchung kaniner kornealer Ulzerationen zu demselben Ergebnis. Ungefähr 50 % der *S. pseudintermedius*-Isolate zeigten dort Resistenzen gegenüber den Antibiotika Erythromycin, Gentamicin, Neomycin oder Polymyxin B.

Staphylococcus epidermidis spielt bei kornealen Defekten und infektiösen Keratitiden eher eine untergeordnete Rolle. Es werden bei Hunden mit ulzerativer/septischer Keratitis zwar regelmäßig Koagulase-negative Staphylokokken-Subspezies nachgewiesen (LIN und PETERSEN-JONES 2007), ob *S. epidermidis* aber tatsächlich als pathogener Erreger an deren Entstehung beteiligt ist, ist eher zweifelhaft, da er beim Hund sowohl an gesunden als auch an erkrankten Augen nachgewiesen werden konnte (WANG et al. 2008). Als opportunistischer Keim kann er allerdings bei einem immunsupprimierten Patienten eine Infektion hervorrufen oder an einer Coinfektion beteiligt sein (GELATT 1999, Kapitel: Clinical microbiology).

Sphingomonas paucimobilis hat ebenfalls einen eher geringen Stellenwert bezüglich der Verursachung oder Beteiligung infektiöser Erkrankungen am Auge. Dieses Bakterium wurde zwar beim Mensch im Rahmen einer Endophthalmitis nach Kataraktoperation nachgewiesen (SEO et al. 2008, MITRA et al. 2018). Hierbei handelt es sich allerdings um Fallberichte, bei welchen die Autoren diesen bakteriologischen Befund als selten ansehen. Für den Hund existieren zu diesem Thema derzeit keine Daten.

Für den Menschen existieren zahlreiche Berichte über eine durch *Staphylococcus hominis* verursachte Endophthalmitis nach Kataraktoperation (IYER et al. 2005, WON und KIM 2013, SYCHEV und VEMULAKONDA 2014). Für den Hund existieren auch zu diesem Thema derzeit keine Daten.

Das Vorkommen von *S. pseudintermedius* sowie allen anderen Erregern in der vorgelegten Arbeit hätte eventuell durch eine mit Antibiotikazusätzen versehene Waschlösung für die Fruchthüllen verhindert werden können. Die Verwendung solcher Lösungen für die Reini-

gung und vorübergehende Lagerung der AM bis zur Kryopräservierung wurde bereits von mehreren Autoren sowohl in der Human- als Veterinärmedizin beschrieben (KIM et al. 2001, SANGWAN et al. 2007, PLUMMER et al. 2009). Dort werden in der Regel einer physiologischen Kochsalzlösung die Antibiotika Penicillin 50 µg/ml, Streptomycin 50 µg/ml, Neomycin 100 µg/ml und Amphotericin B 2,5 µg/ml beigefügt. Für zukünftige Untersuchungen der KAM zur Anwendung bei kornealen Defekten beim Hund kann also folglich über eine Behandlung der Fruchthüllen mit solch einer Lösung nachgedacht werden. Betrachtet man allerdings das Erregerspektrum, so handelt es sich mehrheitlich um niederpathogene Bakterien, sodass ein restriktiver Antibiotikaeinsatz durchaus sinnvoll erscheint.

Ebenfalls als positiv zu werten ist, dass 9 der 11 Isolate aus dieser Arbeit erst nach Anreicherung nachweisbar waren, man also von einer eher niedrigen Keimbelastung ausgehen kann. Zudem wurden beide Erreger (*S. pseudintermedius* und *S. epidermidis*), die beim Hund in Bezug auf die bakterielle/ulzerative Keratitis am ehesten eine Rolle spielen können, nur bei Proben an Tag 0 also der nativen KAM nachgewiesen. Diese kommt im klinischen Alltag in aller Regel nicht zur Anwendung, da sich das Ereignis der Entnahme zeitlich selten mit einer geeigneten Indikation überschneidet. Im Verlauf der Kryopräservierung der KAM kommt es in den Untersuchungen dieser Arbeit zu keinem sichtbaren Anstieg der bakteriellen Besiedlung. Vier von fünf Amnien, die an Tag 0 ein positives bakterielles Wachstum aufweisen, zeigen an Tag 1, 90 und 180 in diesem Punkt keinen positiven Befund. Lediglich ein Amnion aus dieser Gruppe zeigt an Tag 180 wieder eine bakterielle Besiedlung. Es handelt sich allerdings um einen anderen Erreger als an Tag 0. Man kann hier wahrscheinlich von einer externen Kontamination ausgehen. Bei den anderen vier besteht die Möglichkeit, dass es durch die Kryokonservierung zu einer Abtötung der Erreger gekommen sein könnte.

Die Literatur betrachtet sie im Hinblick auf die mikrobiologische Sicherheit mehrheitlich als effektives Verfahren. So konnten beispielsweise THOMASEN et al. (2011) in keiner ihrer kryokonservierten Amnionproben in Glycerin ein Wachstum von Bakterien oder Pilzen feststellen. Des Weiteren existieren Hinweise, dass dieser Umstand den antibakteriellen als auch antimykotischen Eigenschaften des Glycerins geschuldet ist (VAN BAARE et al. 1998, MARAL et al. 1999). Es ist also am ehesten davon auszugehen, dass es sich bei den positiven bakteriellen Nachweisen der Tage 90 und 180 um Kontaminationen, verursacht durch die Überführung aus der Konservierungslösung in das Kulturmedium, handelt. Der Umstand, dass es sich hierbei um niederpathogene (*Staphylococcus hominis*, *Streptococcus cristatus*, *Staphylococcus warneri*) bzw. unklar pathogene (*Paenibacillus amylolyticus*) Bakterien handelt, die zudem hauptsächlich beim Mensch oder in der Umwelt vorkommen, stützt diese These zusätzlich. Ob es sich an Tag 1 ebenfalls um eine Kontaminante handelt ist schwerer zu beantworten, da die hier das Glycerin erst kurze Zeit wirken konnte. Bei dem nachgewiesenen Bakterium handelt es sich um *Staphylococcus warneri*, welches wie oben beschrieben auf der menschlichen jedoch nicht auf der kaninen Nasenschleimhaut zu

finden ist, wahrscheinlich also auch eine Kontamination darstellt. Auch die Befunden an Tag 0 sind am ehesten durch eine Kontamination von außen zu erklären. Im Unterschied zu den Tagen 1, 90 und 180 kann zumindest für *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus pseudintermedius* die mögliche Quelle die Hündin selbst sein, da beide Erreger physiologischerweise auf der Haut bzw. der Haut- und Schleimhautoberfläche von Hunden vorkommen können. *Brevibacillus parabrevis* und *Sphingomonas paucimobilis* stellen jedoch wahrscheinlich wieder Kontaminanten aus der Umgebung bzw. dem Mensch dar. Die Wahrscheinlichkeit, dass die nachweisbaren Erreger aus einer in utero Infektion stammen, ist verschwindend gering, da keines der Bakterien zu den klassischen Infektionserregern im Reproduktionstrakt des Hundes gehört.

5.6 Fazit

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit liegen erstmalig umfassende Erkenntnisse über die morphologischen, morphometrischen und mikrobiellen Eigenschaften der kaninen Amnionmembran (KAM), während und nach der Kryokonservierung vor.

Der eher mäßige bis schlechte Zustand aller drei untersuchten morphologischen Merkmale der KAM bereits vor der Lagerung in Glycerin bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ steht im Widerspruch zur humanmedizinischen Literatur auf diesem Gebiet. Dort zeigt sich in aller Regel eine gut erhaltene Gewebestruktur. Die KAM ist allerdings wesentlich dünner und empfindlicher. Durch ein zu stark degeneriertes oder gar abgelöstes Amnionepithel kommt es zu einer weiteren Dickenabnahme der ohnehin schon fragilen KAM, sodass das Handling sowie das intraoperative Aufbringen der Membran möglicherweise zusätzlich erschwert wird. In Bezug auf den klinischen Nutzen bei der Verwendung der KAM zur Behandlung kornealer Defekte ist ein intaktes Epithel aber wahrscheinlich nicht nötig, da die Basalmembran die entscheidende Rolle bei der Reepithelisierung der Hornhaut spielt. Die Basalmembran zeigt in der vorliegenden Studie vor der Kryokonservierung eine gute Integrität. Diese verschlechterte sich tendenziell über die Zeit der Lagerung, wobei sich der Unterschied zwischen Tag 90 und 180 ($p=0,07$) dem festgelegten Signifikanzniveau annähert, sodass eine erfolgreiche Verwendung der KAM nach dem 90.sten Tag der Kryopräservierung angezweifelt werden muss.

Die Gesamtdicke des kaninen Amnions ist mit $12,77\text{ }\mu\text{m}$ ($7,6\text{-}40,08\text{ }\mu\text{m}$) im frischen Zustand im Vergleich zur humanen ($20\text{-}500\text{ }\mu\text{m}$) und equinen Amnionmembran (Allantoamnion = $71,1\text{ }\mu\text{m} \pm 32,3$) deutlich geringer und erschwert so höchstwahrscheinlich die Gewinnung sowie das intraoperative Handling am Auge. Die mehrheitliche Dickenzunahme der KAM bei einer Spaltenbildung des Stromas könnte auf der anderen Seite die Handhabung des Gewebes wieder etwas erleichtern. Trotzdem ist eine schnellere Degradation dieses feinen Gewebes im Vergleich zur HAM oder EAM vorstellbar, vor allem wenn ein infiziertes Milieu, wie zum Beispiel bei komplizierten einschmelzenden Ulzerationen der Hornhaut, vorherrscht.

Die mikrobiologischen Resultate dieser Arbeit erbrachten vor allem den Nachweis nieder- oder apathogener Bakterien. Ein negatives bakterielles Wachstum an allen Untersuchungszeitpunkten wäre zwar wünschenswert gewesen, die hier nachgewiesenen Erreger und deren zufällig wirkende Verteilung sprechen allerdings eher für das Vorliegen einer Kontamination als einer echten Infektion. Sie spielen also bei der Verwendung der KAM als Transplantat am Auge vermutlich eher eine untergeordnete Rolle für das klinische Resultat.

Durch diese Arbeit ergeben sich folgende weiterführende Fragen, die vor dem klinischen Einsatz in weiteren Untersuchungen geklärt werden sollten:

1. Was könnte an der Präparation und/oder an dem Kryoverfahren verbessert werden um die Qualität der KAM zu steigern?

Es ist vorstellbar, dass bereits durch die sterilen Wattetupfer, welche für die Trennung der fetalen Häute voneinander verwendet wurden, Schäden an dem fragilen Gewebe gesetzt wurden, sodass für diesen Arbeitsschritt nur die behandschuhten angefeuchteten Hände verwendet werden sollten. In Bezug auf die Kryopräservierung könnte die Lagerungstemperatur auf -196 °C reduziert werden um jegliche zelluläre Aktivität zum Erliegen zu bringen und so weiter ablaufende Abbauprozesse des Gewebes zu verhindern. Des Weiteren ist eine Modifikation des Einfrier- und Auftauprozesses denkbar. Beide sind in der vorliegenden Studie langsam abgelaufen, sodass man im Gegensatz dazu einen schnellen Einfrierprozess, bei dem es zu einer Vitrifikation kommt, und einen schnellen Auftauprozess beispielsweise im Wasserbad bei 37 °C durchführen müsste um deren Auswirkungen auf die Qualität der KAM zu prüfen.

2. Ist die kryokonservierte KAM zum jetzigen Zeitpunkt bereits am Patient einsetzbar?

Die KAM kann in kryokonservierter Form an ausgewählten Patienten zur Unterstützung der Hornhautheilung, insbesondere der Epithelisierung eingesetzt werden. Bei einschmelzenden Ulzerationen würde die vorzeitige Zerstörung der dünnen Amnionmembran vermutlich diesem fördernden Effekt zuvor kommen. Weiterhin ist zu beachten, dass durch die KAM keinerlei eigenständige tektonische Stabilisierung der Bulbuswand gewährleistet werden kann. Nach den Ergebnissen dieser Studie sollte die KAM zunächst nicht nach dem 90. Tag der Kryopräservierung am Patienten zum Einsatz kommen.

3. Welche weiterführenden Untersuchungen sind für eine genauere Beurteilung der klinischen Anwendbarkeit der KAM sinnvoll?

Um die reepithelisierenden Eigenschaften der KAM nach der Kryopräservierung zu evaluieren, wäre eine In-vitro-Studie denkbar, in der die Kultivierung kaniner kornealer Epithelzellen auf der kryokonservierten KAM an den Tagen 1, 90 und 180 untersucht wird. So könnte man feststellen, ob es auch nach einer längeren Lagerungszeit bei -80 °C zu einem suffizienten Einwachsen von Epithelzellen auf der KAM kommt. Einer breiten klinischen Anwendung könnte ebenfalls eine experimentelle In-vivo-Studie vorangestellt werden, mit deren Hilfe die korneale Wundheilung mit Unterstützung der kryokonservierten KAM

untersucht wird. Konkret könnte anhand von standardisierten in Allgemeinanästhesie gesetzten kornealen Defekten bei einer definierten Anzahl von Versuchshunden die Reepithelisierung nach Behandlung mit kryokonservierten KAM untersucht werden. In der Vergleichsgruppe sollte ein etabliertes Verfahren zum Abdecken kornealer Defekte, wie die kerato-konkuntivale Verschiebeplastik, zur Anwendung kommen.

6 Zusammenfassung

Sophie Buchheim

Untersuchungen zur Präservierung von kaninem Amnion für die Anwendung bei Kornea-defekten

Klinik für Kleintiere der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Veterinär-anatomisches Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im April 2019

99 Seiten, 43 Abbildungen, 13 Tabellen, 337 Literaturangaben

Schlüsselwörter: Kanine Amnionmembran – Kryopräservierung – morphologische/ morphometrische/mikrobielle Eigenschaften – Qualitätsverlust – korneale Defekte – allogenes Transplantat – Hund

Einleitung: Die Amnionmembran (AM) stellt aufgrund ihrer wundheilungsfördernden und narbenreduzierenden Eigenschaften ein nützliches Substrat zur erfolgreichen Behandlung kornealer Läsionen bei Mensch und Tier dar. Beim Hund kommen derzeit für diese Indikation überwiegend xenogene Transplantate zum Einsatz, über allogene Transplantate liegen nur sehr wenige Informationen vor. Um die zeitnahe Verfügbarkeit der AM zu sichern, stellt die Kryopräservierung zurzeit ihre häufigste Lagerungsmöglichkeit über einen längeren Zeitraum von bis zu zwei Jahren dar.

Ziele der Untersuchungen: Das Ziel der vorgelegten Arbeit war die Untersuchung der morphologischen, morphometrischen und mikrobiellen Eigenschaften der kaninen Amnionmembran (KAM) zum Zeitpunkt der Gewinnung und über die Zeit der Kryopräservierung bis zu 180 Tagen. Untersucht wurden qualitätsbestimmende morphologische Merkmale mit dem Fokus auf in der Literatur beschriebenen Indikatoren für Qualitätsverluste. Weiterhin sollte anhand der Ergebnisse dieser Untersuchungen ein Ausblick bezüglich der Anwendbarkeit der KAM bei kornealen Defekten als allogenes Transplantat gegeben werden.

Material und Methoden: Für die Untersuchungen wurden insgesamt 26 kanine Amnien (KAM) aus 14 Kaiserschnitten entnommen. Die histologische und mikrobiologische Beurteilung erfolgte an der frisch entnommenen KAM sowie an Tag 1, 90 und 180 der Kryopräservierung. Die Untersuchung des Epithels, des Stromas, des Mikrovillisaums sowie die morphometrische Untersuchung erfolgte an Hand von Paraffinschnitten mit Hilfe der PAS-Reaktion. Des Weiteren wurde eine immunhistologische Darstellung des Glykoproteins Laminin zur Bewertung der Basalmembran (BM) des kaninen Amnions verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte für jedes untersuchte morphologi-

sche/morphometrische Merkmal zum einen mit Hilfe deskriptiver Trendregressionen um eine mögliche Tendenz bezüglich einer Qualitätsänderung über die Zeit der Kryopräserva-tion zu erkennen, zum anderen mit Hilfe von fünf Medianvergleichstests, die innerhalb dieser Merkmale sowie über den Zeitraum der Lagerung mögliche statistisch signifikante Unterschiede detektieren sollten. Dabei wurde ein Signifikanzniveau von 95 % ($p = 0,05$) festgelegt.

Ergebnisse: Die KAM zeigte bereits vor der Kryopräserva-tion in der lichtmikroskopischen Untersuchung deutliche morphologische Alterationen, welche durch eine Epithel-zelldegeneration, stromale Spaltenbildung sowie einen schlecht erhaltenen Mikrovillisaum der Epithelzellen deutlich wurden. Über die Zeit der Kryopräserva-tion kam es grundsätzlich zu keiner weiteren Verschlechterung dieser Merkmale. Die für ein klinisch gutes Er-gebnis relevante Basalmembran der KAM wies in den frischen, fixierten Amnionproben (Tag 0) ebenfalls bereits eine mäßige Qualität in Bezug auf ihre Abgrenzbarkeit zu den umliegenden Strukturen auf. Es zeigten sich allerdings nur wenige Unterbrechungen der Immunreaktionslinie, was zu diesem Zeitpunkt als gute Integrität der BM gewertet wurde. Diese verschlechterte sich aber tendenziell über die Zeit der Lagerung hin zu einer mäßigen Integrität, wobei sich die Verschlechterung zwischen Tag 90 und 180 ($p = 0,07$) dem fest-gelegten Signifikanzniveau annäherte. Die Gesamtdicke der frischen, fixierten KAM ist mit im Median $12,77 \mu\text{m}$ ($7,6-40,08 \mu\text{m}$) im Speziesvergleich deutlich geringer (humane Amnionmembran $20-500 \mu\text{m}$) und zeigte zudem im zeitlichen Verlauf der Kryopräser-vation eine leichte Reduktion, wobei diese nur zwischen den frisch fixierten Proben und den Proben an Tag 1 der Lagerung deutlich war. Zwischen dem Merkmal Dicke der KAM und deren Stromabeschaffenheit besteht bei den Proben der Tage 90 und 180 ein positiver signifikanter Zusammenhang. Bei einer Verschlechterung der Stromabeschaffenheit, also vermehrter Spaltenbildung, kommt es hier zu einem Anstieg der Gesamtdicke der Amnien. Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung zeigten bei 11 % der Untersuchungs-zeitpunkte ein positives bakterielles Wachstum. Hier handelte es sich mehrheitlich um nieder- bzw. apathogene Bakterienspezies, die wahrscheinlich eine Kontamination dar-stellen. Keine der Proben zeigte ein Wachstum von Pilzen.

Fazit: Mit der hier vorliegenden Arbeit ist es gelungen die kanine Amnionmembran erst-malig, sowohl im frischen als auch im kryokonservierten Zustand, in ihren morphologi-schen, morphometrischen und mikrobiellen Eigenschaften zu beschreiben. Der klinische Einsatz der kryokonservierten KAM kann anhand der hier vorliegenden Ergebnisse für die Behandlung kornealer Defekte beim Hund bei ausgewählten Patienten bereits zum jetzigen Zeitpunkt erfolgen. Die Dauer der Kryopräserva-tion bis zur Anwendung der KAM am Patienten sollte einen Zeitraum von 90 Tagen aber zunächst nicht überschreiten. Da es sich hierbei um ein sehr dünnes, fragiles Gewebe handelt, sollte es besonders vorsichtig mani-puliert werden. Ob der mäßige bis schlechte Zustand der KAM, sowohl im frischen als auch kryokonservierten Zustand, einen Einfluss auf das klinische Ergebnis hat, muss durch weiterführende Studien geklärt werden.

7 Summary

Sophie Buchheim

Studies on the preservation of canine amnion for the use in corneal defects

Department of Small Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Institute of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted april 2019

99 pages, 43 figures, 13 tables, 337 references

Keywords: canine amniotic membrane – cryopreservation – morphological/ morphometric/microbiological properties – quality loss – corneale defects – allogeneic –transplant – dog

Introduction: The amniotic membrane (AM) is a useful substrate for the successful treatment of corneal lesions in humans and animals because of its wound-healing and scar-reducing properties. In dogs, xenogenic grafts are currently used for this indication. There is only little information available on allograft transplants. To ensure the timely availability of AM, the cryopreservation currently represents the most common storage method over a longer period of up to two years.

Objective: The aim of this study was the documentation of the morphological, morphometric and microbial properties of the canine amniotic membrane (CAM) at the time of harvesting and over the period of cryopreservation until 180 days. Quality determining morphological characteristics were examined with a focus on indicators for quality loss, which are described in the literature. Another goal was to use the derived results to evaluate the applicability of the CAM as an allograft in corneal defects.

Material and Methods: For the investigation, 26 canine amniotic membranes (CAM) were obtained from 14 cesarean sections. The histological and microbiological evaluation was conducted based on the freshly taken CAM and on day 1, 90 and 180 of the cryopreservation. The examination of the epithelium, stroma and microvilli, as well as the morphometric analysis were performed on paraffin sections using the PAS staining method. Furthermore, an immunohistological staining of the glycoprotein laminin was used to evaluate the basement membrane (BM) of the canine amnion. In the statistical analysis of each morphological/morphometric characteristic, descriptive trend regressions were employed to detect potential quality changes during cryopreservation. Additionally, the analysis was supplemented by five specifications of median tests, each testing for significant

differences in characteristics between periods. The significance level was set to 95 % ($p = 0.05$).

Results: In the light microscopic examination, the CAM already showed distinct morphological alterations before cryopreservation, which were evident by an epithelial cell degeneration, stromal clefting and poorly preserved microvilli of the epithelial cells. Over the course of cryopreservation, there was basically no further deterioration of these features. In the fresh and fixed amnion specimens (day 0), the basement membrane of the CAM, which is relevant for a clinically good result, also showed a moderate quality in terms of its differentiability from the surrounding structures. However, there were only a few interruptions of the immune response line, which, at this point, was considered as good integrity of the BM. Unfortunately, over the storage period, it tended to deteriorate to a moderate integrity, with the deterioration approaching the specified level of significance between day 90 and 180 ($p = 0.07$). With a median of $12.77 \mu\text{m}$ ($7.6\text{-}40.08 \mu\text{m}$), the total thickness of the fresh and fixed CAM is significantly lower in the species comparison (human amniotic membrane $20\text{-}500 \mu\text{m}$) and also showed a slight reduction over the period of the cryopreservation, which was only evident between day 0 and 1 samples. The characteristic thickness of the CAM and its stromal constitution are significantly positively correlated for the samples of days 90 and 180. An increase in the overall thickness of the amniotic membranes tends to be caused by a deteriorating stromal constitution via gap formation. In 11% of analysed days, the results of the microbiological examination exhibited positive bacterial growth, which was caused by low or non-pathogenic bacterial species. With a high probability, the latter have their origins in a contamination during progressing. None of the samples showed fungal growth.

Conclusion: For the first time, it has been possible to describe the morphological, morphometric and microbial properties of the canine amniotic membrane either in its fresh as well in its cryopreserved state. The presented results already allow the clinical use of the cryopreserved CAM for the treatment of corneal defects in dogs in selected cases. As a preliminary suggestion, CAMs with cryopreservation periods of more than 90 days should not be used in patients. Because the CAM is a very thin, fragile tissue, it should be handled very carefully. The question of whether the moderate to poor state of CAM, in both the fresh and cryopreserved state, has an impact on the clinical outcome, has to be answered in future research.

Literaturverzeichnis

- Adds PJ, Hunt C, Hartley S. Bacterial contamination of amniotic membrane. *Br J Ophthalmol* 2001; 85(2):228–30.
- Adinolfi M, Akle CA, McColl I, Fensom AH, Tansley L, Connolly P et al. Expression of HLA antigens, beta 2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells. *Nature* 1982; 295(5847):325–7.
- Ahmadi AJ, Jakobiec FA. Corneal wound healing: Cytokines and extracellular matrix proteins. *Int Ophthalmol Clin* 2002; 42(3):13–22.
- Ahn J-I, Jang I-K, Lee D-H, Seo Y-K, Yoon H-H, Shin Y-H et al. A comparison of lyophilized amniotic membrane with cryopreserved amniotic membrane for the reconstruction of rabbit corneal epithelium. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2005; 10(3):262–9.
- Akle CA, Adinolfi M, Welsh KI, Leibowitz S, McColl I. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet* 1981; 2(8254):1003–5.
- Alegre M-L, Lakkis FG, Morelli AE. Antigen Presentation in Transplantation. *Trends Immunol* 2016; 37(12):831–43.
- Allen CL, Clare G, Stewart EA, Branch MJ, McIntosh OD, Dadhwal M et al. Augmented dried versus cryopreserved amniotic membrane as an ocular surface dressing. *PLoS ONE* 2013; 8(10):e78441.
- Ambrósio R, Kara-José N, Wilson SE. Early keratocyte apoptosis after epithelial scrape injury in the human cornea. *Exp Eye Res* 2009; 89(4):597–9.
- Anderson DF. Amniotic membrane transplantation for partial limbal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol* 2001; 85(5):567–75.
- Andonovska D, Dzokic G, Spasevska L, Trajkovska T, Popovska K, Todorov I et al. The advantages of the application of amnion membrane in the treatment of burns. *Prilozi* 2008; 29(1):183–98.
- Anson ML, Edsall JT. *Advances in protein chemistry. Vol II*: New York: Academic Press; 1945.
- Arcadi JA. Extracellular matrix in prostate adenocarcinoma. *Urol Oncol: Seminars and Original Investigations* 1997; 3(4):113–7.
- Arcelli R, Tibaldini P, Angeli G, Bellezza E. Equine amniotic membrane transplantation in some ocular surface diseases in the dog and cat: A preliminary study. *Vet Res Commun* 2009; 33 Suppl 1:169–71.
- Argüeso P, Gipson IK. Epithelial mucins of the ocular surface: Structure, biosynthesis and function. *Exp Eye Res* 2001; 73(3):281–9.
- Arnold W. *Physiologie der Haustiere. 5. Aufl.* Stuttgart: Enke Verlag; 2015.
- Aughey E, Frye FL. *Comparative veterinary histology: With clinical correlates.* London: Manson Pub./Veterinary Press; 2001.
- Aumailley M, Smyth N. The role of laminins in basement membrane function. *J Anat* 1998; 193 (Pt 1):1–21.
- Baldry MGC. The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *J Appl Bacteriol* 1983; 54(3):417–23.

- Barachetti L, Giudice C, Mortellaro CM. Amniotic membrane transplantation for the treatment of feline corneal sequestrum: Pilot study. *Vet Ophthalmol* 2010; 13(5):326–30.
- Barbosa FL, Chaurasia SS, Cutler A, Asosingh K, Kaur H, Medeiros FW de et al. Corneal myofibroblast generation from bone marrow-derived cells. *Exp Eye Res* 2010; 91(1):92–6.
- Barros PSM, Safatle AMV, Godoy CA, Souza MSB, Barros LFM, Brooks DE. Amniotic membrane transplantation for the reconstruction of the ocular surface in three cases. *Vet Ophthalmol* 2005; 8(3):189–92.
- Battifora H. Assessment of antigen damage in immunohistochemistry. The vimentin internal control. *Am J Clin Pathol* 1991; 96(5):669–71.
- Baum J. Thygeson lecture. Amniotic membrane transplantation: Why is it effective? *Cornea* 2002; 21(4):339–41.
- Baum J, Barza M. Topical vs Subconjunctival Treatment of Bacterial Corneal Ulcers. *Ophthalmology* 1983; 90(2):162–8.
- Bedford PGC, Grierson I, McKechnie NM. Corneal epithelial inclusion cyst in the dog. *J Small Animal Practice* 1990; 31(2):64–8.
- Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN. *Pathology of the Human Placenta*. 6. Aufl. Berlin: Springer Berlin; 2013.
- Bentley E, Abrams GA, Covitz D, Cook CS, Fischer CA, Hacker D et al. Morphology and Immunohistochemistry of Spontaneous Chronic Corneal Epithelial Defects (SCCED) in Dogs. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001; 42(10):2262–9.
- Bertaina A, Andreani M. Major Histocompatibility Complex and Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Beyond the Classical HLA Polymorphism. *Int J Mol Sci* 2018; 19(2).
- Bettelheim FA, Plessy B. The hydration of proteoglycans of bovine cornea. *Biochim Biophys Acta* 1975; 381(1):203–14.
- Bhatia M, Pereira M, Rana H, Stout B, Lewis C, Abramson S et al. The Mechanism of Cell Interaction and Response on Decellularized Human Amniotic Membrane: Implications in Wound Healing. *Wounds* 2007; 19(8):207–17.
- Bigbie RB, Schumacher J, Swaim SF, Purohit RC, Wright JC. Effects of amnion and live yeast cell derivative on second-intention healing in horses. *Am J Vet Res* 1991; 52(8):1376–82.
- Bogic LV, Brace RA, Cheung CY. Cellular localization of vascular endothelial growth factor in ovine placenta and fetal membranes. *Placenta* 2000; 21(2-3):203–9.
- Borazjani A, Weed BC, Patnaik SS, Feugang JM, Christiansen D, Elder SH et al. A comparative biomechanical analysis of term fetal membranes in human and domestic species. *Am J Obstet Gynecol* 2011; 204(4):365.e25-36.
- Boudreau N, Sympton CJ, Werb Z, Bissell MJ. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 1995; 267(5199):891–3.
- Bourne G. The foetal membranes. A review of the anatomy of normal amnion and chorion and some aspects of their function. *Postgrad Med J* 1962; 38:193–201.
- Bourne GL. The microscopic anatomy of the human amnion and chorion. *Am J Obstet Gynecol* 1960; 79:1070–3.

- Branski LK, Herndon DN, Celis MM, Norbury WB, Masters OE, Jeschke MG. Amnion in the treatment of pediatric partial-thickness facial burns. *Burns* 2008; 34(3):393–9.
- Brauninger GE, Shah DO, Kaufman HE. Direct physical demonstration of oily layer on tear film surface. *Am J Ophthalmol* 1972; 73(1):132–4.
- Buck RC. Hemidesmosomes of normal and regenerating mouse corneal epithelium. *Virchows Arch B, Cell Pathol* 1982; 41(1-2):1–16.
- Buck RC. Ultrastructural characteristics associated with the anchoring of corneal epithelium in several classes of vertebrates. *J Anat* 1983; 137 (Pt 4):743–56.
- Bukowiecki A, Hos D, Cursiefen C, Eming SA. Wound-Healing Studies in Cornea and Skin: Parallels, Differences and Opportunities. *Int J Mol Sci* 2017; 18(6).
- Burgos H. Angiogenic and growth factors in human amnio-chorion and placenta. *Eur J Clin Invest* 1983; 13(4):289–96.
- Cameron JD, Hagen ST, Waterfield RR, Furcht LT. Effects of matrix proteins on rabbit corneal epithelial cell adhesion and migration. *Curr Eye Res* 1988; 7(3):293–301.
- Castoro JA, Bettelheim AA, Bettelheim FA. Water gradients across bovine cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988; 29(6):963–8.
- Champagne ES, Munger RJ. Multiple punctate keratotomy for the treatment of recurrent epithelial erosions in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 1992; 28(3):213–6.
- Chaurasia SS, Kaur H, Medeiros FW de, Smith SD, Wilson SE. Dynamics of the expression of intermediate filaments vimentin and desmin during myofibroblast differentiation after corneal injury. *Exp Eye Res* 2009; 89(2):133–9.
- Chen F, Fukuse T, Hasegawa S, Bando T, Hanaoka N, Kawashima M et al. Effective application of ET-Kyoto solution for clinical lung transplantation. *Transplant Proc* 2004; 36(9):2812–5.
- Chiu C-J. Intestinal Mucosal Lesion in Low-Flow States. *Arch Surg* 1970; 101(4):478.
- Choi US, Labelle P, Kim S, Kim J, Cha J, Lee KC et al. Successful treatment of an unusually large corneal epithelial inclusion cyst using equine amniotic membrane in a dog. *Vet Ophthalmol* 2010; 13(2):122–5.
- Chung JH, Kang YG, Kim HJ. Effect of 0.1% dexamethasone on epithelial healing in experimental corneal alkali wounds: Morphological changes during the repair process. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1998; 236(7):537–45.
- Cirman T, Beltram M, Schollmayer P, Rožman P, Kreft ME. Amniotic membrane properties and current practice of amniotic membrane use in ophthalmology in Slovenia. *Cell Tissue Bank* 2014; 15(2):177–92.
- Clark BAJ. Mean Topography of normal corneas. *Aust J Optom* 1974; 57(4):107–14.
- Collin SP, Collin HB. A comparative SEM study of the vertebrate corneal epithelium. *Cornea* 2000; 19(2):218–30.
- Cooke M, Tan EK, Mandrycky C, He H, O'Connell J, Tseng SCG. Comparison of cryopreserved amniotic membrane and umbilical cord tissue with dehydrated amniotic membrane/chorion tissue. *J Wound Care* 2014; 23(10):465–74, 476.
- Cox HU, Hoskins JD, Newman SS, Foil CS, Turnwald GH, Roy AF. Temporal study of staphylococcal species on healthy dogs. *Am J Vet Res* 1988; 49(6):747–51.
- Cox HU, Hoskins JD, Newman SS, Turnwald GH, Foil CS, Roy AF et al. Distribution of staphylococcal species on clinically healthy cats. *Am J Vet Res* 1985; 46(9):1824–8.

- Crowe JH, Crowe LM, Oliver AE, Tsvetkova N, Wolkers W, Tablin F. The trehalose myth revisited: Introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology* 2001; 43(2):89–105.
- Cursiefen C, Schlötzer-Schrehardt U, Kuchle M, Sorokin L, Breiteneder-Geleff S, Alitalo K et al. Lymphatic vessels in vascularized human corneas: Immunohistochemical investigation using LYVE-1 and podoplanin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43(7):2127–35.
- Davis JS. II. Skin Grafting at the Johns Hopkins Hospital. *Ann Surg* 1910; 50(3):542–9.
- Day R. Polysaccharides in ocular tissue. *Am J Ophthalmol* 1950; 33(2):224–6.
- Dekaris I, Gabrić N. Preparation and preservation of amniotic membrane. *Dev Ophthalmol* 2009; 43:97–104.
- Devriese LA, Pelsmaecker K de. The anal region as a main carrier site of *Staphylococcus intermedius* and *Streptococcus canis* in dogs. *Vet Rec* 1987; 121(13):302–3.
- Diecke FP, Cacace VI, Montalbetti N, Ma L, Kuang K, Iserovich P et al. Comparative permeabilities of the paracellular and transcellular pathways of corneal endothelial layers. *J Membr Biol* 2011; 242(1):41–51.
- Doughty MJ. Changes in cell surface primary cilia and microvilli concurrent with measurements of fluid flow across the rabbit corneal endothelium *ex vivo*. *Tissue Cell* 1998; 30(6):634–43.
- Douglas B. Homografts of fetal membranes as a covering for large wounds; especially those from burns; an experimental and clinical study. *J Tn State Med Assoc* 1952; 45(6):230–5.
- Dowling PM, Grahn BH. Antimicrobial therapy of ocular infections. *Can Vet J* 1998; 39(2):121–4.
- Drenckhahn D, Asan E, Benninghoff A, Hrsg. Herz-Kreislauf-System, lymphatisches System, endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut. 16. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer; 2004.
- Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol* 2000; 44(5):415–25.
- Dua HS, Gomes JAP, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol* 2004; 49(1):51–77.
- Duan-Arnold Y, Gyurdieva A, Johnson A, Jacobstein DA, Danilkovitch A. Soluble Factors Released by Endogenous Viable Cells Enhance the Antioxidant and Chemoattractive Activities of Cryopreserved Amniotic Membrane. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2015; 4(6):329–38.
- Duan-Arnold Y, Gyurdieva A, Johnson A, Uveges TE, Jacobstein DA, Danilkovitch A. Retention of endogenous viable cells enhances the anti-inflammatory activity of cryopreserved amnion. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2015; 4(9):523–33.
- Eaglstein WH, Mertz PM, Falanga V. Wound dressings: Current and future. *Prog Clin Biol Res* 1991; 365:257–65.
- Eiff C von, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis* 2002; 2(11):677–85.
- Engelhardt Wv, Breves G, Hrsg. *Physiologie der Haustiere*. Stuttgart: Enke; 2000.

- Eule C. Der Tränenfilm - Überlebensfaktor für das Auge. *kleintier konkret* 2007; 10(1):14–8.
- Favaron PO, Carvalho RC, Borghesi J, Anuniação ARA, Miglino MA. The Amniotic Membrane: Development and Potential Applications - A Review. *Reprod Domest Anim* 2015; 50(6):881–92.
- Fetterolf DE, Snyder RJ. Scientific and clinical support for the use of dehydrated amniotic membrane in wound management. *Wounds* 2012; 24(10):299–307.
- Fischbarg J. Water channels and their roles in some ocular tissues. *Mol Aspects Med* 2012; 33(5-6):638–41.
- Fishman IJ, Flores FN, Scott FB, Spjut HJ, Morrow B. Use of fresh placental membranes for bladder reconstruction. *J Urol* 1987; 138(5):1291–4.
- Fitzgerald JR. The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: Species reclassification, pathogenesis and the emergence of meticillin resistance. *Vet Dermatol* 2009; 20(5-6):490–5.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. Basic principles of cryopreservation. 2012 (zitiert vom 13.11.18): 85-94, <http://www.fao.org/3/i3017e/i3017e04.pdf>
- Foschi D, Castoldi L, Corsi F, Radaelli E, Trabucchi E. Inhibition of inflammatory angiogenesis in rats by loco-regional administration of hydrocortisone and protamine. *Agents Actions* 1994; 42(1-2):40–3.
- Fukuda K, Chikama T, Nakamura M, Nishida T. Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva. *Cornea* 1999; 18(1):73–9.
- Füst A, Pállinger E, Stündl A, Kovács E, Imre L, Tóth S et al. Both freshly prepared and frozen-stored amniotic membrane cells express the complement inhibitor CD59. *ScientificWorldJournal* 2012; 2012:815615.
- Gabler B, Lohmann CP. Hypopyon after repeated transplantation of human amniotic membrane onto the corneal surface. *Ophthalmology* 2000; 107(7):1344–6.
- Gajiwala K, Gajiwala AL. Evaluation of lyophilised, gamma-irradiated amnion as a biological dressing. *Cell Tissue Bank* 2004; 5(2):73–80.
- Galask RP, Snyder IS. Antimicrobial factors in amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 1970; 106(1):59–65.
- Gallagher BC. Primary cilia of the corneal endothelium. *Am J Anat* 1980; 159(4):475–84.
- Gelatt KN, Hrsg. *Veterinary ophthalmology*. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999.
- Gelatt KN, Hrsg. *Essentials of veterinary ophthalmology*. 3. Aufl.. Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc; 2014.
- Gelatt KN, Gelatt JP. *Handbook of small animal ophthalmic surgery*. 1. Aufl. Oxford: Pergamon; 1995.
- Gelatt KN, Gelatt JP. *Veterinary ophthalmic surgery*. Edinburgh: Saunders; 2011.
- Gelatt KN, Gilger BC, Kern TJ. *Veterinary Ophthalmology: Two Volume Set*. 5. Aufl. s.l.: Wiley-Blackwell; 2013.
- Ghahramani L, Jahromi AB, Dehghani MR, Ashraf MJ, Rahimikazerooni S, Rezaianzadeh A et al. Evaluation of repair in duodenal perforation with human amniotic membrane: An animal model (dog). *Adv Biomed Res* 2014; 3:113.

- Gharib M, Ure BM, Klose M. Use of amniotic grafts in the repair of gastroschisis. *Pediatr Surg Int* 1996; 11(2-3):96–9.
- Gicquel J-J, Dua HS, Brodie A, Mohammed I, Suleman H, Lazutina E et al. Epidermal growth factor variations in amniotic membrane used for ex vivo tissue constructs. *Tissue Eng Part A* 2009; 15(8):1919–27.
- Gilger BC, Whitley RD, McLaughlin SA, Wright JC, Drane JW. Canine corneal thickness measured by ultrasonic pachymetry. *Am J Vet Res* 1991; 52(10):1570–2.
- Gilger BC, Wright JC, Whitley RD, McLaughlin SA. Corneal thickness measured by ultrasonic pachymetry in cats. *Am J Vet Res* 1993; 54(2):228–30.
- Goodrich LR, Moll HD, Crisman MV, Lessard P, Bigbie RB. Comparison of equine amnion and a nonadherent wound dressing material for bandaging pinch-grafted wounds in ponies. *Am J Vet Res* 2000; 61(3):326–9.
- Gosling AA, Labelle AL, Breaux CB. Management of spontaneous chronic corneal epithelial defects (SCCEDs) in dogs with diamond burr debridement and placement of a bandage contact lens. *Vet Ophthalmol* 2013; 16(2):83–8.
- Grady EN, MacDonald J, Liu L, Richman A, Yuan Z-C. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: A review. *Microb Cell Fact* 2016; 15(1):203.
- Gritz DC, Kwitko S, Trousdale MD, Gonzalez VH, McDonnell PJ. Recurrence of microbial keratitis concomitant with antiinflammatory treatment in an animal model. *Cornea* 1992; 11(5):404–8.
- Gwin RM, Lerner I, Warren JK, Gum G. Decrease in canine corneal endothelial cell density and increase in corneal thickness as functions of age. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982; 22(2):267–71.
- Haberich FJ, Lingelbach B. Kritische Übersicht über unsere Kenntnisse und Vorstellung einer neuen Arbeitshypothese über die Stabilität des präkornealen Tränenfilms (PKTF). *Klin Monbl Augenheilkd* 1982; 180(2):115–26.
- Hahn A, Thanos M, Reinhard T, Seitz B, Steuhl K-P, Meller D. Arbeitsrichtlinien: Gute fachliche Praxis zur Gewinnung und Herstellung von kryokonservierter humaner Amnionmembran aus Spenderplazenta. *Ophthalmologe* 2010; 107(11):1020–31.
- Hahnel C, Somodi S, Weiss DG, Guthoff RF. The keratocyte network of human cornea: A three-dimensional study using confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Cornea* 2000; 19(2):185–93.
- Han J-I, Yang C-H, Park H-M. Prevalence and risk factors of *Staphylococcus* spp. carriage among dogs and their owners: A cross-sectional study. *Vet J* 2016; 212:15–21.
- Hanada K, Shimazaki J, Shimmura S, Tsubota K. Multilayered amniotic membrane transplantation for severe ulceration of the cornea and sclera. *Am J Ophthalmol* 2001; 131(3):324–31.
- Hanna C, Bicknell DS, O'Brien JE. Cell turnover in the adult human eye. *Arch Ophthalmol* 1961; 65:695–8.
- Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 2000; 19(3):348–52.
- Hariharan H, McPhee L, Heaney S, Bryenton J. Antimicrobial drug susceptibility of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can Vet J* 1995; 36(3):166–8.
- Hart WM. Hydration and transparency of cornea. *Am J Ophthalmol* 1947; 30(8):1022–4.

- Hatami-Marbini H, Etebu E. Hydration dependent biomechanical properties of the corneal stroma. *Exp Eye Res* 2013; 116:47–54.
- Hauk A. Der Unterschied zwischen mono- und polyklonalen Antikörpern. *Biologie in unserer Zeit* 2014; 44(3):156.
- Hennerbichler S, Reichl B, Pleiner D, Gabriel C, Eibl J, Redl H. The influence of various storage conditions on cell viability in amniotic membrane. *Cell Tissue Bank* 2007; 8(1):1–8.
- Hermans MHE. Clinical experience with glycerol-preserved donor skin treatment in partial thickness burns. *Burns* 1989; 15(1):57–9.
- Hettiarachchi D, Dissanayake VHW, Goonasekera HWW. Optimizing amniotic membrane tissue banking protocols for ophthalmic use. *Cell Tissue Bank* 2016; 17(3):387–97.
- Hieber AD, Corcino D, Motosue J, Sandberg LB, Roos PJ, Yu SY et al. Detection of elastin in the human fetal membranes: Proposed molecular basis for elasticity. *Placenta* 1997; 18(4):301–12.
- Higa K, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Hyaluronic acid-CD44 interaction mediates the adhesion of lymphocytes by amniotic membrane stroma. *Cornea* 2005; 24(2):206–12.
- Hindman HB, Patel SB, Jun AS. Rationale for adjunctive topical corticosteroids in bacterial keratitis. *Arch Ophthalmol* 2009; 127(1):97–102.
- Holly FJ, Lemp MA. Tear physiology and dry eyes. *Surv Ophthalmol* 1977; 22(2):69–87.
- Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62(1-3):3–22.
- Hori J, Wang M, Kamiya K, Takahashi H, Sakuragawa N. Immunological characteristics of amniotic epithelium. *Cornea* 2006; 25(10 Suppl 1):S53-8.
- Hu DJ, Basti S, Wen A, Bryar PJ. Prospective Comparison of Corneal Re-Epithelialization Over the Stromal and Basement Membrane Surfaces of Preserved Human Amniotic Membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44(13):3151.
- Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, Kita M, Sotozono C, Kinoshita S. Growth factors: Importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog Retin Eye Res* 2000; 19(1):113–29.
- Iorio V, Troughton LD, Hamill KJ. Laminins: Roles and Utility in Wound Repair. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2015; 4(4):250–63.
- Iranpour S, Mahdavi-Shahri N, Miri R, Hasanzadeh H, Bidkhorri HR, Naderi-Meshkin H et al. Supportive properties of basement membrane layer of human amniotic membrane enable development of tissue engineering applications. *Cell Tissue Bank* 2018; 19(3):357-371.
- Iyer MN, Wirostko WJ, Kim SH, Simons KB. Staphylococcus hominis endophthalmitis associated with a capsular hypopyon. *Am J Ophthalmol* 2005; 139(5):930–2.
- Jakus MA. Studies on the cornea. II. The fine structure of Descemet's membrane. *J Biophys Biochem Cytol* 1956; 2(4 Suppl):243–52.
- Jester JV, Barry-Lane PA, Petroll WM, Olsen DR, Cavanagh HD. Inhibition of corneal fibrosis by topical application of blocking antibodies to TGF beta in the rabbit. *Cornea* 1997; 16(2):177–87.

- Jester JV, Huang J, Barry-Lane PA, Kao WW, Petroll WM, Cavanagh HD. Transforming growth factor(beta)-mediated corneal myofibroblast differentiation requires actin and fibronectin assembly. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40(9):1959–67.
- Jester JV, Moller-Pedersen T, Huang J, Sax CM, Kays WT, Cavanagh HD et al. The cellular basis of corneal transparency: Evidence for 'corneal crystallins'. *J Cell Sci* 1999; 112 (Pt 5):613–22.
- Jester JV, Petroll WM, Barry PA, Cavanagh HD. Expression of alpha-smooth muscle (alpha-SM) actin during corneal stromal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36(5):809–19.
- Jester JV, Ho-Chang J. Modulation of cultured corneal keratocyte phenotype by growth factors/cytokines control in vitro contractility and extracellular matrix contraction. *Exp Eye Res* 2003; 77(5):581–92.
- Jester JV, Huang J, Matthew Petroll W, Dwight Cavanagh H. TGF β Induced Myofibroblast Differentiation of Rabbit Keratocytes Requires Synergistic TGF β , PDGF and Integrin Signaling. *Exp Eye Res* 2002; 75(6):645–57.
- Jirsova K, Jones GLA. Amniotic membrane in ophthalmology: Properties, preparation, storage and indications for grafting—a review. *Cell Tissue Bank* 2017; 18(2):193–204.
- Kafarnik C, Fritsche J, Reese S. In vivo confocal microscopy in the normal corneas of cats, dogs and birds. *Vet Ophthalmol* 2007; 10(4):222–30.
- Kalpravidh M, Tuntivanich P, Vongsakul S, Sirivaidyapong S. Canine amniotic membrane transplantation for corneal reconstruction after the excision of dermoids in dogs. *Vet Res Commun* 2009; 33(8):1003–12.
- Kang G-M, Ko MK. Morphological characteristics and intercellular connections of corneal keratocytes. *Korean J Ophthalmol* 2005; 19(3):213–8.
- Kanyshkova TG, Buneva VN, Nevinsky GA. Lactoferrin and its biological functions. *Biochemistry Mosc* 2001; 66(1):1–7.
- Kariya Y, Yasuda C, Nakashima Y, Ishida K, Tsubota Y, Miyazaki K. Characterization of laminin 5B and NH2-terminal proteolytic fragment of its alpha3B chain: Promotion of cellular adhesion, migration, and proliferation. *J Biol Chem* 2004; 279(23):24774–84.
- Kenyon KR. Anatomy and pathology of the ocular surface. *Int Ophthalmol Clin* 1979; 19(2):3–35.
- Kern TJ. Ulcerative Keratitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1990; 20(3):643–66.
- Kesting MR, Wolff K-D, Nobis CP, Rohleder NH. Amniotic membrane in oral and maxillofacial surgery. *Oral Maxillofac Surg* 2014; 18(2):153–64.
- Kim JC, Tseng SC. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995; 14(5):473–84.
- Kim JS, Kim JC, Hahn TW, Park WC. Amniotic membrane transplantation in infectious corneal ulcer. *Cornea* 2001; 20(7):720–6.
- Kim JS, Kim JC, Na BK, Jeong JM, Song CY. Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. *Exp Eye Res* 2000; 70(3):329–37.
- Kim JY, Choi YM, Jeong SW, Williams DL. Effect of bovine freeze-dried amniotic membrane (Amnisite-BA) on uncomplicated canine corneal erosion. *Vet Ophthalmol* 2009; 12(1):36–42.

- Klein JD, Turner CGB, Steigman SA, Ahmed A, Zurakowski D, Eriksson E et al. Amniotic mesenchymal stem cells enhance normal fetal wound healing. *Stem Cells Dev* 2011; 20(6):969–76.
- Klenkler B, Sheardown H, Jones L. Growth factors in the tear film: Role in tissue maintenance, wound healing, and ocular pathology. *Ocul Surf* 2007; 5(3):228–39.
- Kline LB, Hull RN. The virucidal properties of peracetic acid. *Am J Clin Pathol* 1960; 33:30–3.
- Kloos WE, George CG, Olgiate JS, van Pelt L, McKinnon ML, Zimmer BL et al. *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* subsp. nov., a novel trehalose- and N-acetyl-D-glucosamine-negative, novobiocin- and multiple-antibiotic-resistant subspecies isolated from human blood cultures. *Int J Syst Bacteriol* 1998; 48 Pt 3:799–812.
- Kloos WE, Schleifer KH. Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin II. Descriptions of Four New Species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans*. *Int J Syst Bacteriol* 1975; 25(1):62–79.
- Klyce SD, Crosson CE. Transport processes across the rabbit corneal epithelium: A review. *Curr Eye Res* 1985; 4(4):323–31.
- Knop E, Knop N. Anatomy and immunology of the ocular surface. *Chem Immunol Allergy* 2007; 92:36–49.
- Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, Fullwood NJ, Quantock AJ, Kinoshita S. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2000; 20(3):173–7.
- Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2001; 108(9):1569–74.
- Kruse FE, Jousen AM, Rohrschneider K, You L, Sinn B, Baumann J et al. Cryopreserved human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000; 238(1):68–75.
- Kruse FE, Rohrschneider K, Völcker HE. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. *Ophthalmology* 1999; 106(8):1504–11.
- Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42(7):1539–46.
- Labelle P, Reilly CM, Naydan DK, Labelle AL. Immunohistochemical characteristics of normal canine eyes. *Vet Pathol* 2012; 49(5):860–9.
- Labermeier U, Kenney MC. The presence of EC collagen and type IV collagen in bovine Descemet's membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 116(2):619–25.
- Lacerda RP, Peña Gimenez MT, Laguna F, Costa D, Ríos J, Leiva M. Corneal grafting for the treatment of full-thickness corneal defects in dogs: A review of 50 cases. *Vet Ophthalmol* 2017; 20(3):222–31.
- Lambiase A, Rama P, Bonini S, Caprioglio G, Aloe L. Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcers. *N Engl J Med* 1998; 338(17):1174–80.
- Lambiase A. Anti-inflammatory and Healing Properties of Nerve Growth Factor in Immune Corneal Ulcers With Stromal Melting. *Arch Ophthalmol* 2000; 118(10):1446.

- Lang G. Formaldehydfixierung: Teil 1: Alte Theorie und moderne Praxis. *Wissenschaft & praxis* 2006;21–5.
- Lang G. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik*. 2. Aufl. Wien, New York: Springer; 2013.
- Lassaline ME, Brooks DE, Ollivier FJ, Komaromy AM, Kallberg ME, Gelatt KN. Equine amniotic membrane transplantation for corneal ulceration and keratomalacia in three horses. *Vet Ophthalmol* 2005; 8(5):311–7.
- Lee SB, Li DQ, Tan DT, Meller DC, Tseng SC. Suppression of TGF-beta signaling in both normal conjunctival fibroblasts and pterygial body fibroblasts by amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2000; 20(4):325–34.
- Lee S-H, Tseng SCG. Amniotic Membrane Transplantation for Persistent Epithelial Defects With Ulceration. *Am J Ophthalmol* 1997; 123(3):303–12.
- Levin LA, Nilsson SFE, Hoeve J ver, Wu S, Kaufman PL, Alm A. *Adler's Physiology of the Eye: Expert Consult*. 11. Aufl. London: Elsevier Health Sciences; 2011.
- Ley-Chávez E, Martínez-Pardo ME, Roman R, Oliveros-Lozano FDJ, Canchola-Martínez E. Application of biological dressings from radiosterilized amnios with cobalt 60 and serologic studies on the handling of burns in pediatric patients. *Ann Transplant* 2003; 8(4):46–9.
- Li H, Niederkorn JY, Neelam S, Mayhew E, Word RA, McCulley JP et al. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(3):900–7.
- Libera RD, Melo GBd, Lima AdS, Haapalainen EF, Cristovam P, Gomes JAP. Assessment of the use of cryopreserved x freeze-dried amniotic membrane (AM) for reconstruction of ocular surface in rabbit model. *Arq Bras Oftalmol* 2008; 71(5):669–73.
- Liebich H-G, Budras K-D. *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis* ; 5. Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2010.
- Liesegang TJ. Contact lens-related microbial keratitis: Part I: Epidemiology. *Cornea* 1997; 16(2):125–31.
- Lilenbaum W, Esteves AL, Souza GN. Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from saliva of clinically normal cats. *Lett Appl Microbiol* 1999; 28(6):448–52.
- Lin C-T, Petersen-Jones SM. Antibiotic susceptibility of bacterial isolates from corneal ulcers of dogs in Taiwan. *J Small Anim Pract* 2007; 48(5):271–4.
- Liu D, Jin J, Xie F, Zhang C, Jianjian LU, Jiajie XU et al. Effects of different cryopreservation methods on the ultrastructure and viability of amniotic membrane. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research* 2015; (15):2376–81.
- Liu J, Sheha H, Fu Y, Liang L, Tseng SC. Update on amniotic membrane transplantation. *Expert Rev Ophthalmol* 2010; 5(5):645–61.
- Ljubimov AV, Saghizadeh M. Progress in corneal wound healing. *Prog Retin Eye Res* 2015; 49:17–45.
- Lo V, Pope E. Amniotic membrane use in dermatology. *Int J Dermatol* 2009; 48(9):935–40.
- Logan Niall A., De Vos Paul. *Brevibacillus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* 2015; S. 1-163.

- Ma DH-K. Amniotic membrane graft for primary pterygium: Comparison with conjunctival autograft and topical mitomycin C treatment. *Br J Ophthalmol* 2000; 84(9):973–8.
- MacCallum DK, Bahn CF, Lillie JH, Meyer RF, Martonyi CL. Evidence for corneal endothelial cell hypertrophy during postnatal growth of the cat cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983; 24(2):247–50.
- Malhotra C, Jain AK. Human amniotic membrane transplantation: Different modalities of its use in ophthalmology. *World J Transplant* 2014; 4(2):111–21.
- Mao Y, Hoffman T, Singh-Varma A, Duan-Arnold Y, Moorman M, Danilkovitch A et al. Antimicrobial Peptides Secreted From Human Cryopreserved Viable Amniotic Membrane Contribute to its Antibacterial Activity. *Sci Rep* 2017; 7(1):13722.
- Maral T, Borman H, Arslan H, Demirhan B, Akinbingol G, Haberal M. Effectiveness of human amnion preserved long-term in glycerol as a temporary biological dressing. *Burns* 1999; 25(7):625–35.
- Martínez Pardo ME, Reyes Frías ML, Ramos Durón LE, Gutiérrez Salgado E, Gómez JC, Marín MA et al. Clinical application of amniotic membranes on a patient with epidermolysis bullosa. *Ann Transplant* 1999; 4(3-4):68–73.
- Maurice DM. The structure and transparency of the cornea. *J Physiol (Lond)* 1957; 136(2):263–86.
- Mazur P. Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984; 247(3 Pt 1):C125-42.
- Mazur P, Leibo SP, Chu EH. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res* 1972; 71(2):345–55.
- Mazur P, Seki S. Survival of mouse oocytes after being cooled in a vitrification solution to –196 C at 95 to 70,000 C/min and warmed at 610 to 118,000 C/min: A new paradigm for cryopreservation by vitrification. *Cryobiology* 2011; 62(1):1–7.
- Medleau L, Long RE, Brown J, Miller WH. Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from canine pyodermas. *Am J Vet Res* 1986; 47(2):229–31.
- Meek KM, Fullwood NJ. Corneal and scleral collagens—a microscopist's perspective. *Micron* 2001; 32(3):261–72.
- Mehta JS, Riau A, D. T. Tan, R. W. Beuerman. Analysis of Matrix Proteins, Growth Factors and Membrane Surface in Commercial Available Freeze-Dried Amniotic Membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; (Vol.49)
- Meller D, Pauklin M, Thomasen H, Westekemper H, Steuhl K-P. Amniotic membrane transplantation in the human eye. *Dtsch Arztebl Int* 2011; 108(14):243–8.
- Meryman HT, Williams RJ, Douglas MS. Freezing injury from "solution effects" and its prevention by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiology* 1977; 14(3):287–302.
- Michael KB, Rotchford A, Ramaesh K. Conjunctival Chemosis as a Specific Feature of *Pseudomonas aeruginosa* Corneal Ulcers. *Cornea* 2016; 35(9):1182–4.
- Mignatti P, Tsuboi R, Robbins E, Rifkin DB. In vitro angiogenesis on the human amniotic membrane: Requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases. *J Cell Biol* 1989; 108(2):671–82.
- Mikulec AA, Tanelian DL. CGRP increases the rate of corneal re-epithelialization in an in vitro whole mount preparation. *J Ocul Pharmacol Ther* 1996; 12(4):417–23.

- Mitra S, Padhi TR, Basu S, Priyadarshini SR, Sharma S. Unusual microbiological presentations in polymicrobial post-operative endophthalmitis and their clinical correlations. *Int Ophthalmol* 2018.
- Miyamoto T, Sumioka T, Saika S. Endothelial mesenchymal transition: A therapeutic target in retrocorneal membrane. *Cornea* 2010; 29 Suppl 1:S52-6.
- Modesti A, Scarpa S, D'Orazi G, Simonelli L, Caramia FG. Localization of type IV and V collagens in the stroma of human amnion. *Prog Clin Biol Res* 1989; 296:459–63.
- Mohan RR, Kim WJ, Wilson SE. Modulation of TNF-alpha-induced apoptosis in corneal fibroblasts by transcription factor NF-kappaB. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(6):1327–36.
- Mohan RR, Liang Q, Kim WJ, Helena MC, Baerveldt F, Wilson SE. Apoptosis in the cornea: Further characterization of Fas/Fas ligand system. *Exp Eye Res* 1997; 65(4):575–89.
- Morgan RV, Abrams KL. A comparison of six different therapies for persistent corneal erosions in dogs and cats. *Veterinary and Comparative Ophthalmology* 1994; 4(1):38–43.
- Mouton C, Reynolds HS, Genco RJ. Characterization of tufted streptococci isolated from the "corn cob" configuration of human dental plaque. *Infect Immun* 1980; 27(1):235–45.
- Mulisch M, Welsch U, Hrsg. *Romeis Mikroskopische Technik*. 19. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2015.
- Müller LJ, Pels E, Vrensen GF. The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. *Br J Ophthalmol* 2001; 85(4):437–43.
- Müller LJ, Pels L, Vrensen GF. Novel aspects of the ultrastructural organization of human corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36(13):2557–67.
- Müller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TMT. Corneal nerves: Structure, contents and function. *Exp Eye Res* 2003; 76(5):521–42.
- Muralidharan S, Gu J, Laub GW, Cichon R, Daloisio C, McGrath LB. A new biological membrane for pericardial closure. *J Biomed Mater Res* 1991; 25(10):1201–9.
- Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Ang LPK, Koizumi N, Yokoi N et al. Transplantation of autologous serum-derived cultivated corneal epithelial equivalents for the treatment of severe ocular surface disease. *Ophthalmology* 2006; 113(10):1765–72.
- Nakamura T, Sekiyama E, Takaoka M, Bentley AJ, Yokoi N, Fullwood NJ et al. The use of trehalose-treated freeze-dried amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Biomaterials* 2008; 29(27):3729–37.
- Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, Fullwood NJ, Ito W, Inatomi T et al. Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: A useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(1):93–9.
- Nam E, Takahashi A, Fujita N, Tsuzuki K, Nishimura R. Cultivation of corneal epithelial cell sheets on canine amniotic membrane. *Vet Ophthalmol* 2013; 16(4):263–8.
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E, Böhme G. *Nervensystem, Sinnesorgane, endokrine Drüsen*. 4. Aufl. Stuttgart: Parey; 2004.
- Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater* 2008; 15:88–99.

- Ocheke AN, Ocheke IE, Agaba PA, Imadde GE, Silas OA, Ajetunmobi OI . Maternal and neonatal outcomes of histological chorioamnionitis. *J West Afr Coll Surg* 2016; 6(3):1–14.
- Oda Y, Fukuda S. Electron Microscopic Studies on the Animals Cornea: I. Bowman's Membrane and Basement Membrane of the Dog and Monkey Corneas. *J Electron Microsc (Tokyo)* 1962; 11(3):179-184.
- Ohji M, Mandarino L, SundarRaj N, Thoft RA. Corneal epithelial cell attachment with endogenous laminin and fibronectin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34(8):2487–92.
- Ollivier FJ, Kallberg ME, Plummer CE, Barrie KP, O'Reilly S, Taylor DP et al. Amniotic membrane transplantation for corneal surface reconstruction after excision of corneal limbal squamous cell carcinomas in nine horses. *Vet Ophthalmol* 2006; 9(6):404–13.
- Ollivier, F. Use of equine amniotic membrane in ophthalmic surgeries in veterinary medicine. U.S. Patent Application Nr. 11/554,019, 2008.
- Ozkan N, Salva E, Cakalağaoğlu F, Tüzüner B. Honey as a substitute for formalin? *Biotech Histochem* 2012; 87(2):148–53.
- Paggiaro AO, Menezes AG, Ferrassi AD, Carvalho VF de, Gemperli R. Biological effects of amniotic membrane on diabetic foot wounds: A systematic review. *J Wound Care* 2018; 27(Sup2):S19-S25.
- Papich MG. Antimicrobials, susceptibility testing, and minimum inhibitory concentrations (MIC) in veterinary infection treatment. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2013; 43(5):1079–89.
- Parry S, Strauss JF. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* 1998; 338(10):663–70.
- Peiffer R., Gelatt K., Gwin R. Superficial keratectomy in the management of indolent ulcers of the boxer cornea. *Canine Pract* 1976; (3):31–3.
- Pellerin JL, Bourdeau P, Sebbag H, Person JM. Epidemiosurveillance of antimicrobial compound resistance of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyodermas. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1998; 21(2):115–33.
- Petersen-Jones S, Hrsg. BSAVA manual of small animal ophthalmology. 2. Aufl. Gloucester: BSAVA; 2002.
- Petroll WM, Kivanany PB, Hagenasr D, Graham EK. Corneal Fibroblast Migration Patterns During Intrastromal Wound Healing Correlate With ECM Structure and Alignment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56(12):7352–61.
- Petty W, Spanier S, Shuster JJ, Silverthorne C. The influence of skeletal implants on incidence of infection. Experiments in a canine model. *J Bone Joint Surg Am* 1985; 67(8):1236–44.
- Pfeiffer RL, Hrsg. Comparative ophthalmic pathology. 3. Aufl. Springfield: Thomas; 1983.
- Plummer CE, Ollivier F, Kallberg M, Brooks D, Barrie K, Utter M et al. The use of amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction: A review and series of 58 equine clinical cases (2002-2008). *Vet Ophthalmol* 2009; 12 Suppl 1:17–24.
- Pollitt CC. Basement membrane pathology: A feature of acute equine laminitis. *Equine Vet J* 1996; 28(1):38–46.

- Poole CA, Brookes NH, Clover GM. Keratocyte networks visualised in the living cornea using vital dyes. *J Cell Sci* 1993; 106 (Pt 2):685–91.
- Pot SA, Gallhöfer NS, Matheis FL, Voelter-Ratson K, Hafezi F, Spiess BM. Corneal collagen cross-linking as treatment for infectious and noninfectious corneal melting in cats and dogs: Results of a prospective, nonrandomized, controlled trial. *Vet Ophthalmol* 2014; 17(4):250–60.
- Prabhasawat P, Kosrirukvongs P, Booranapong W, Vajaradul Y. Application of Preserved Human Amniotic Membrane for Corneal Surface Reconstruction. *Cell Tissue Bank* 2000; 1(3):213–22.
- Prabhasawat P, Tesavibul N. Preserved Amniotic Membrane Transplantation for Conjunctival Surface Reconstruction. *Cell Tissue Bank* 2001; 2(1):31–9.
- Qureshi IZ, Fareeha A, Khan WA. Technique for processing and preservation of human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *World Acad Sci Eng Technol* 2010; 69:763–6.
- Radner W, Zehetmayer M, Aufreiter R, Mallinger R. Interlacing and cross-angle distribution of collagen lamellae in the human cornea. *Cornea* 1998; 17(5):537–43.
- Rama P, Giannini R, Bruni A, Gatto C, Tiso R, Ponzin D. Further evaluation of amniotic membrane banking for transplantation in ocular surface diseases. *Cell Tissue Bank* 2001; 2(3):155–63.
- Ramsey DT, Pope ER, Wagner-Mann C, Berg JN, Swaim SF. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wounds in dogs. *Am J Vet Res* 1995; 56(7):941–9.
- Ramuta TŽ, Kreft ME. Human Amniotic Membrane and Amniotic Membrane-Derived Cells: How Far Are We from Their Use in Regenerative and Reconstructive Urology? *Cell Transplant* 2018; 27(1):77–92.
- Reid TW, Murphy CJ, Iwahashi CK, Foster BA, Mannis MJ. Stimulation of epithelial cell growth by the neuropeptide substance P. *J Cell Biochem* 1993; 52(4):476–85.
- Rejzek A, Weyer F, Eichberger R, Gebhart W. Physical changes of amniotic membranes through glycerolization for the use as an epidermal substitute. Light and electron microscopic studies. *Cell Tissue Bank* 2001; 2(2):95–102.
- Rennekampff H-O, Dohrmann P, Föry R, Fandrich F. Evaluation of Amniotic Membrane as Adhesion Prophylaxis in a Novel Surgical Gastroschisis Model. *J Invest Surg* 2009; 7(3):187–93.
- Resch MD, Schlötzer-Schrehardt U, Hofmann-Rummelt C, Sauer R, Kruse FE, Beckmann MW et al. Integration patterns of cryopreserved amniotic membranes into the human cornea. *Ophthalmology* 2006; 113(11):1927–35.
- Riau AK, Beuerman RW, Lim LS, Mehta JS. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials* 2010; 31(2):216–25.
- Robson MC, Krizek TJ. The effect of human amniotic membranes on the bacteria population of infected rat burns. *Ann Surg* 1973; 177(2):144–9.
- Rodrigues GN, Laus JL, Santos JM, Rigueiro MP, Smith RL. Corneal endothelial cell morphology of normal dogs in different ages. *Vet Ophthalmol* 2006; 9(2):101–7.

- Rodríguez-Ares MT, López-Valladares MJ, Touriño R, Vieites B, Gude F, Silva MT et al. Effects of lyophilization on human amniotic membrane. *Acta Ophthalmol* 2009; 87(4):396–403.
- Rolando M, Zierhut M. The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease. *Surv Ophthalmol* 2001; 45 Suppl 2:S203-10.
- Romeis B, Aescht E, Mulisch M, Hrsg. Romeis Mikroskopische Technik. 18. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.; 2010.
- Roshanravan R, Ghahramani L, Hosseinzadeh M, Mohammadipour M, Moslemi S, Rezaianzadeh A et al. A new method to repair recto-vaginal fistula: Use of human amniotic membrane in an animal model. *Adv Biomed Res* 2014; 3:114.
- Rossi CC, Salgado BAB, Barros EM, Campos Braga PA de, Eberlin MN, Lilenbaum W et al. Identification of *Staphylococcus epidermidis* with transferrable mupirocin resistance from canine skin. *Vet J* 2018; 235:70–2.
- Rotth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes. *Arch Ophthal* 1940; 23(3):522–5.
- Rubin JE, Chirino-Trejo M. Prevalence, sites of colonization, and antimicrobial resistance among *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from healthy dogs in Saskatoon, Canada. *J Vet Diagn Invest* 2011; 23(2):351–4.
- Ryan MP, Adley CC. *Sphingomonas paucimobilis*: A persistent Gram-negative nosocomial infectious organism. *J Hosp Infect* 2010; 75(3):153–7.
- Sabater AL, Perez VL. Amniotic membrane use for management of corneal limbal stem cell deficiency. *Curr Opin Ophthalmol* 2017; 28(4):363–9.
- Sabella, N. Use of fetal membranes in skin grafting. *Med Rec NY* 83 (1913) 478-480.
- Saini A, Rapuano CJ, Laibson PR, Cohen EJ, Hammersmith KM. Episodes of microbial keratitis with therapeutic silicone hydrogel bandage soft contact lenses. *Eye Contact Lens* 2013; 39(5):324–8.
- Sangwan V, Burman S, Tejwani S, Mahesh S, Murthy R. Amniotic membrane transplantation: A review of current indications in the management of ophthalmic disorders. *Indian J Ophthalmol* 2007; 55(4):251.
- Schlegel T, Brehm H, Amselgruber WM. IgA and secretory component (SC) in the third eyelid of domestic animals: A comparative study. *Vet Ophthalmol* 2003; 6(2):157–61.
- Schmitz S. *Der Experimentator: Zellkultur*. 3. Aufl. Heidelberg: Springer Spektrum; 2011.
- Schneider H, Husslein P, Schneider K-TM. *Die Geburtshilfe*. 5. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016.
- Schnorr B, Kressin M. *Embryologie der Haustiere: Ein Kurzlehrbuch*. 4. Aufl. Stuttgart: Enke; 2001.
- Sedlarik KM, Hrsg. *Wundheilung: Mit 39 Tabellen*. 2. Aufl. Jena: G. Fischer; 1993.
- Seitz B, Resch MD, Schlötzer-Schrehardt U, Hofmann-Rummelt C, Sauer R, Kruse FE. Histopathology and ultrastructure of human corneas after amniotic membrane transplantation. *Arch Ophthalmol* 2006; 124(10):1487–90.
- Seo SW, Chung IY, Kim E, Park JM. A case of postoperative *Sphingomonas paucimobilis* endophthalmitis after cataract extraction. *Korean J Ophthalmol* 2008; 22(1):63–5.

- Shao C, Sima J, Zhang SX, Jin J, Reinach P, Wang Z et al. Suppression of corneal neovascularization by PEDF release from human amniotic membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(6):1758–62.
- Sherrard ES, Ng YL. The other side of the corneal endothelium. *Cornea* 1990; 9(1):48–54.
- Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, Tsubota K. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea* 2001; 20(4):408–13.
- Shively JN, Epling GP. Fine structure of the canine eye: Cornea. *Am J Vet Res* 1970; 31(4):713–22.
- Singh R, Gupta P, Kumar P, Kumar A, Chacharkar MP. Properties of Air Dried Radiation Processed Amniotic Membranes under Different Storage Conditions. *Cell Tissue Bank* 2003; 4(2-4):95–100.
- Singh V, Agrawal V, Santhiago MR, Wilson SE. Stromal fibroblast-bone marrow-derived cell interactions: Implications for myofibroblast development in the cornea. *Exp Eye Res* 2012; 98:1–8.
- Smollich A, Michel G. *Mikroskopische Anatomie der Haustiere*, 2. Aufl. Jena: Gustav Fischer; 1992.
- Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SC. Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol* 2001; 85(4):444–9.
- Sorsby A, Symons H. Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye: (Burns of the second degree). *Br J Ophthalmol* 1946; 30(6):337–45.
- Spadea L, Giammaria D, Trabucco P. Corneal wound healing after laser vision correction. *Br J Ophthalmol* 2016; 100(1):28–33.
- Stades FC. *Praktische Augenheilkunde für den Tierarzt*. 3. Aufl. Hannover: Schlüter; 2006.
- Sun Y-Z, Guo L, Zhang F-S. Curative effect assessment of bandage contact lens in neurogenic keratitis. *Int J Ophthalmol* 2014; 7(6):980–3.
- Suter A, Voelter K, Hartnack S, Spiess BM, Pot SA. Septic keratitis in dogs, cats, and horses in Switzerland: Associated bacteria and antibiotic susceptibility. *Vet Ophthalmol* 2018; 21(1):66–75.
- Swanson EA, Freeman LJ, Seleem MN, Snyder PW. Biofilm-infected wounds in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 2014; 244(6):699–707.
- Sychev YV, Vemulakonda GA. Chronic *Staphylococcus hominis* endophthalmitis following injury with a retained intraocular foreign body. *Eye (Lond)* 2014; 28(12):1517.
- Takashima S, Yasuo M, Sanzen N, Sekiguchi K, Okabe M, Yoshida T et al. Characterization of laminin isoforms in human amnion. *Tissue Cell* 2008; 40(2):75–81.
- Talan DA, Goldstein EJ, Staatz D, Overturf GD. *Staphylococcus intermedius*: Clinical presentation of a new human dog bite pathogen. *Ann Emerg Med* 1989; 18(4):410–3.
- Talmi YP, Sigler L, Inge E, Finkelstein Y, Zohar Y. Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta* 1991; 12(3):285–8.
- Tan EK, Cooke M, Mandrycky C, Mahabole M, He H, O'Connell J et al. Structural and Biological Comparison of Cryopreserved and Fresh Amniotic Membrane Tissues. *J biomater tissue eng* 2014; 4(5):379–88.
- Terranova VP, Lyall RM. Chemotaxis of human gingival epithelial cells to laminin. A mechanism for epithelial cell apical migration. *J Periodontol* 1986; 57(5):311–7.

- Thomas S. Functions of a wound dressing. *Wound management and dressings*. Pharmaceutical Press, London, 1990, S. 9-19.
- Thomasen H, Pauklin M, Noelle B, Geerling G, Vetter J, Steven P et al. The effect of long-term storage on the biological and histological properties of cryopreserved amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2011; 36(3):247–55.
- Tolar EL, Hendrix DVH, Rohrbach BW, Plummer CE, Brooks DE, Gelatt KN. Evaluation of clinical characteristics and bacterial isolates in dogs with bacterial keratitis: 97 cases (1993-2003). *J Am Vet Med Assoc* 2006; 228(1):80–5.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(5):349–63.
- Tóth J, Hollerrieder J, Sótonyi PT. *Augenheilkunde beim Pferd*. 1. Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2010.
- Trelford JD, Trelford-Sauder M. The amnion in surgery, past and present. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 134(7):833–45.
- Tripathi RC, Raja SC, Tripathi BJ. Prospects for epidermal growth factor in the management of corneal disorders. *Surv Ophthalmol* 1990; 34(6):457–62.
- Tseng SC, Prabhasawat P, Lee SH. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am J Ophthalmol* 1997; 124(6):765–74.
- Tseng SCG. Amniotic Membrane Transplantation With or Without Limbal Allografts for Corneal Surface Reconstruction in Patients With Limbal Stem Cell Deficiency. *Arch Ophthalmol* 1998; 116(4):431.
- Tseng SCG, Li D-Q, Ma X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF- β : Receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol* 1999; 179(3):325–35.
- Tsubota K, Higuchi A. Serum application for the treatment of ocular surface disorders. *Int Ophthalmol Clin* 2000; 40(4):113–22.
- Tsuzuki K, Yamashita K, Izumisawa Y, Kotani T. Microstructure and glycosaminoglycan ratio of canine cornea after reconstructive transplantation with glycerin-preserved porcine amniotic membranes. *Vet Ophthalmol* 2008; 11(4):222–7.
- Tuft SJ, Coster DJ. The corneal endothelium. *Eye (Lond)* 1990; 4 (Pt 3):389–424.
- Twedt DC, Bonagura JD, Hrsg. *Kirk's current veterinary therapy*: 15. Aufl. St. Louis, Mo: Elsevier/Saunders; 2014.
- Ulfig N, Brand-Saber B. *Kurzlehrbuch Embryologie*. 3. Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2017.
- van Baare J, Buitenwerf J, Hoekstra MJ, Du Pont JS. Virucidal effect of glycerol as used in donor skin preservation. *Burns* 1994; 20:S77-S80.
- van Baare J, Ligtvoet EE, Middelkoop E. Microbiological evaluation of glycerolized cadaveric donor skin. *Transplantation* 1998; 65(7):966–70.
- van Buskirk EM. The anatomy of the limbus. *Eye (Lond)* 1989; 3 (Pt 2):101–8.
- van Duijkeren E, Box ATA, Heck MEOC, Wannet WJB, Fluit AC. Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. *Vet Microbiol* 2004; 103(1-2):91–7.

- van Herendael BJ, Oberti C, Brosens I. Microanatomy of the human amniotic membranes. A light microscopic, transmission, and scanning electron microscopic study. *Am J Obstet Gynecol* 1978; 131(8):872–80.
- Verkman AS. Role of aquaporin water channels in eye function. *Exp Eye Res* 2003; 76(2):137–43.
- Versen-Höyneck F von, Hesselbarth U, Möller DE. Application of sterilised human amnion for reconstruction of the ocular surface. *Cell Tissue Bank* 2004; 5(1):57–65.
- Versen-Höyneck F von, Syring C, Bachmann S, Möller DE. The Influence of Different Preservation and Sterilisation Steps on the Histological Properties of Amnion Allografts – Light and Scanning Electron Microscopic Studies. *Cell Tissue Bank* 2004; 5(1):45–56.
- Wagner M, Walter P, Salla S, Johnen S, Plange N, Rütten S et al. Cryopreservation of amniotic membrane with and without glycerol additive. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2018.
- Walde I. *Augenheilkunde: Lehrbuch und Atlas ; Hund, Katze, Kaninchen und Meerschweinchen*. 3. Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2008.
- Wang B-y, Wu J, Lamont RJ, Lin X, Xie H. Negative correlation of distributions of *Streptococcus cristatus* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque. *J Clin Microbiol* 2009; 47(12):3902–6.
- Wang L, Pan Q, Zhang L, Xue Q, Cui J, Qi C. Investigation of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Beijing, China. *Vet Ophthalmol* 2008; 11(3):145–9.
- Wang W-Y, Lee Y-K, Tsai S-H, Lin Y-C, Chen Y-M. Autologous Serum Eye Drops Combined With Silicone Hydrogen Lenses for the Treatment of Postinfectious Corneal Persistent Epithelial Defects. *Eye Contact Lens* 2017; 43(4):225–9.
- Wang Y, Chen M, Wolosin JM. ZO-1 in corneal epithelium; stratal distribution and synthesis induction by outer cell removal. *Exp Eye Res* 1993; 57(3):283–92.
- Wasielewski R von, Werner M, Nolte M, Wilkens L, Georgii A. Effects of antigen retrieval by microwave heating in formalin-fixed tissue sections on a broad panel of antibodies. *Histochemistry* 1994; 102(3):165–72.
- Weese JS, van Duijkeren E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet Microbiol* 2010; 140(3-4):418–29.
- Wehrend A, Hrsg. *Neonatalogie beim Hund: Von der Geburt bis zum Absetzen*. 2. Aufl. Hannover: Schlüter; 2013.
- Werckenthin C, Cardoso M, Martel JL, Schwarz S. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. *Vet Res* 2001; 32(3-4):341–62.
- Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 2000; 24(7):1016–9.
- Wichayacoop T, Briksawan P, Tuntivanich P, Yibchok-Anun S. Anti-inflammatory effects of topical supernatant from human amniotic membrane cell culture on canine deep corneal ulcer after human amniotic membrane transplantation. *Vet Ophthalmol* 2009; 12(1):28–35.

-
- Wilkie DA, Whittaker C. Surgery of the cornea. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1997; 27(5):1067–107.
- Wilshaw S-P, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering. *Tissue Eng* 2006; 12(8):2117–29.
- Wilson SE, He YG, Weng J, Li Q, McDowall AW, Vital M et al. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: Hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Exp Eye Res* 1996; 62(4):325–7.
- Wilson SE, Mohan RR, Ambrósio R, Hong J, Lee J. The corneal wound healing response: Cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog Retin Eye Res* 2001; 20(5):625–37.
- Wolbank S, Hildner F, Redl H, van Griensven M, Gabriel C, Hennerbichler S. Impact of human amniotic membrane preparation on release of angiogenic factors. *J Tissue Eng Regen Med* 2009; 3(8):651–4.
- Won JY, Kim M. Vancomycin-resistant *Staphylococcus hominis* endophthalmitis following cataract surgery. *Clin Ophthalmol* 2013; 7:1193–5.
- Yang L, Shirakata Y, Shudou M, Dai X, Tokumaru S, Hirakawa S et al. New skin-equivalent model from de-epithelialized amnion membrane. *Cell Tissue Res* 2006; 326(1):69–77.
- Yoshita T, Kobayashi A, Sugiyama K, Tseng SCG. Oxygen permeability of amniotic membrane and actual tear oxygen tension beneath amniotic membrane patch. *Am J Ophthalmol* 2004; 138(3):486–7.
- Young AL, Cheng ACO, Ng HK, Cheng LL, Leung GYS, Lam DSC. The use of autologous serum tears in persistent corneal epithelial defects. *Eye (Lond)* 2004; 18(6):609–14.
- Yu F-SX, Yin J, Xu K, Huang J. Growth factors and corneal epithelial wound healing. *Brain Res Bull* 2010; 81(2-3):229–35.
- Zieske JD. Extracellular matrix and wound healing. *Curr Opin Ophthalmol* 2001; 12(4):237–41.

Anhang

Protokoll der immunhistologischen Färbung (Laminin)

- Entparaffinierung der Schnitte mit 2x Xylol, 2x Isopropanol, 1x 96%igem Alkohol und 2x Xylol
- Inaktivierung der endogenen Peroxidase mit 3 %igem Methanol
- Spülen mit TBS
- 15 Minuten in Aqua dest. bei 95 °C zur Minimierung der Hintergrundfärbung
- Schnitte 10 Minuten bei Raumtemperatur abkühlen lassen
- Protease-Vorbehandlung zur Antigendemaskierung
- Spülen mit TBS
- 30 Minuten blocken der unspezifischen Bindungen mit 5%igem Ziegen Serum in TBS
- Inkubation mit dem Primärantikörper bzw. Kaninchenkontrollserum (Kaninchen - anti - Laminin) in einer 1 : 750 Verdünnung in TBS über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank
- Spülen mit TBS
- Inkubation des Envision-Systems für 30 Minuten bei Raumtemperatur zur Detektion des Primärantikörpers
- Spülen mit TBS
- Zugabe des DAB zur Visualisierung der Antigen-Antikörperreaktion
- Spülen mit TBS
- Gegenfärben mit Papanicolaou (Kernfärbung)
- Entwässern der Schnitte mit einer aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 96% iger Alkohol, Isopropanol und 2x Xylol)
- Eindecken der Schnitte mit einem Folienband, welches mit einem Xylol löslichen Klebstoff beschichtet ist mit Hilfe eines Eindeckautomaten