

**Epiretinale Befestigung
laserperforierter Polydimethylsiloxanstrukturen
durch Proliferation Müller'scher Stützglia der Retina**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Rheinisch-Westfälischen-Technischen-Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologe
Hans Christian Friedrich Lüdtkke-Handjery

aus

Herne

Berichter: Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Fritz Kreuzaler
Univ.-Prof. Dr.med. Christian Mittermayer

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juni 2001

Berichte aus der Biologie

Hans Christian Lüdtké-Handjery

**Epiretinale Befestigung
laserperforierter Polydimethylsiloxan-Strukturen
durch Proliferation Müller'scher Stützglia**

D 82 (Diss. RWTH Aachen)

Shaker Verlag
Aachen 2001

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Lüdtke-Handjery, Hans Christian:

Epiretinale Befestigung laserperforierter Polydimethylsiloxan-Strukturen durch Proliferation Müller'scher Stützglia / Hans Christian Lüdtke-Handjery.

Aachen : Shaker, 2001

(Berichte aus der Biologie)

Zugl.: Aachen, Techn. Hochsch., Diss., 2001

ISBN 3-8265-9230-1

Copyright Shaker Verlag 2001

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8265-9230-1

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 1290 • 52013 Aachen
Telefon: 02407/95 96 - 0 • Telefax: 02407/95 96 - 9
Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1 Zielsetzung der Arbeit	1
1.2 Einführung und Hintergrund	1
1.3 Eingesetzte Methoden	2
1.4 Ergebnisse	2
1.5 Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse und Ausblick	3
2. EINLEITUNG	4
2.1 Prothetik und Kurzzeitimplantation	4
2.2 Die dauerhafte Implantation	5
2.3 Anforderungen an ein Implantat	6
2.4 'Tissue Engineering'	9
2.5 Anatomie und Physiologie des Auges	12
2.6 <i>Retina</i> und Sehwahrnehmung	13
2.7 Entwicklung von Implantatwerkstoffen für die Ophthalmologie	16
2.8 Müller-Zellen	17
2.9 Degenerative Erkrankungen der <i>Retina</i>	19
2.9.1 Altersbedingte <i>Makuladegeneration</i> (AMD)	19
2.9.2 <i>Retinitis Pigmentosa</i>	21
2.10 Der <i>Retina</i> -Stimulator	22
2.11 Ziele der Arbeit	24
3. MATERIAL	26
3.1 Herstellung von PDMS-Folien	26
3.2 Kultur von permanenten Maus-Fibroblasten	26
3.3 Vitalfärbung von Zellen	27
3.4 Autoradiographie	28
3.5 Szintillationszählung	28
3.6 Naßchemische Modifikation von PDMS-Oberflächen	28
3.7 Kultur retinaler Gliazellen (Müller-Zellen)	28
3.8 Anfertigung von Schnittpräparaten	30
3.9 Anfertigung von Schliffpräparaten	31
3.10 Rasterelektronenmikroskopie	31
3.11 Antikörpernachweis von Gliazellmarkern	32

4. METHODEN	33
4.1 Manuelle Herstellung von Silikon-Folien	33
4.2 Herstellen von Silikon-Folien im Spin-Coater	33
4.3 Perforation von Silikon-Folien	33
4.4 Vermeidung von Ablagerungen (Debris) während der Perforation	34
4.5 Zellverträglichkeit der PVA-Beschichtung	34
4.6 Zellverträglichkeitsprüfung mit direktem Materialkontakt	34
4.6.1 Vitalfärbung von Zellen	35
4.6.2 Morphologie	35
4.6.3 „Zellspreading“	35
4.6.4 Autoradiographie	36
4.6.5 Proteinbestimmung	36
4.7 Zellverträglichkeitsprüfung mit Materialextrakten	37
4.7.1 Szintillationszählung	37
4.8 Naßchemische Modifikation von PDMS-Oberflächen	38
4.8.1 Plasmaätzung	38
4.8.2 Pfröpfkopolymerisation	38
4.8.3 Proteinbeschichtung	38
4.8.4 Kontaktwinkelmessung	39
4.8.5 Messung der Zelladhäsion auf modifizierten Polymeroberflächen im Rheometer	39
4.9 Isolation von Müller Zellen aus frisch enukleierten Schweineaugen	40
4.10 In vitro-Besiedelung von Polymer-Folien mit retinalen Gliazellen	40
4.11 Fixierung von Zellen	41
4.12 Analyse des Dreidimensionalen Wachstums im Rasterelektronenmikroskop (REM)	41
4.13 Nachweis von Gliazellmarkern mit Antikörpern	41
4.14 Anfertigung von Schnittpräparaten	42
4.14.1 Färbung von Schnittpräparaten	42
4.15 Anfertigung von Schliffpräparaten	42
4.15.1 Färbung von Schliffpräparaten	43
5. ERGEBNISSE	44
5.1 Auswahl von Schweineaugen zur Isolierung von Müller’schen Gliazellen	44
5.2 Optimierung der Isolierungsmethode	47
5.2.1 Reinheit der Kultur in Abhängigkeit von der Dauer des Nagarseverdaus	47
5.2.2 Reinheit der Kultur in Abhängigkeit von der Anzahl der Sedimentationsschritte	48
5.3 Charakterisierung primärer Müller-Zellen <i>in vitro</i>	49
5.3.1 Vitalität und Morphologie	49
5.3.2 Expression von Gliazell-Markerproteinen	52
5.3.3 Kultivierungszeit bis zum Einsetzen der Seneszens	54
5.3.4 Passage der primären Zellen	54
5.3.5 Festlegung der Mindestzellzahl zur Ausplattierung	56
5.3.7 Vorversuch zur Steigerung der Proliferation durch Wachstumsfaktoren	57
5.4 Adhäsion von glialen Zellen auf dem Silikon und Optimierung der Perforation	59

5.5	Direkte Zellverträglichkeit	59
5.4.2	Zellverträglichkeit der Materialextrakte	60
5.4.3	Vorversuche zur Festlegung des Porendurchmessers	61
5.4.4	Perforation von Polydimethylsiloxan (PDMS) mit Excimer-Laser	63
5.4.5	Zellverträglichkeitsuntersuchung der Ablagerungen (Debris)	65
5.4.6	Vermeidung der Ablagerungen (Debris) durch Prä-Coating	66
5.4.7	Chemische Oberflächenbehandlung	67
5.4.8	Adhäsionsmessungen im Rheometer	68
5.5	Nachweis des Einwachsens retinaler Gliazellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	70
5.5.1	Nachweis der Befestigung <i>in vitro</i>	70
5.5.2	<i>In vitro</i> -Zellwachstum auf anderen Polymeren	71
5.5.3	Ergänzende Ergebnisse zur Befestigung <i>in vivo</i>	73
6.	DISKUSSION	76
6.1	Auswahl von Schweineaugen als Quelle primärer Gliazellen	77
6.2	Identifizierung der Zellen anhand glialer Markerproteine und ihrer Morphologie	78
6.3	Charakterisierung primärer Müller-Zellen <i>in vitro</i>	80
6.4	Vorschläge für die Kontrolle der Glianarbenbildung durch Müller-Zellen <i>in vivo</i>	83
6.5	Immunologische Aspekte der Befestigung durch Gliazellen	85
6.5.1	Bioverträglichkeit des PDMS	86
6.6	Perforation und Verbesserung der Adhäsion von Zellen auf dem Silikon	87
6.7	Chemische Oberflächenmodifikation	88
6.7.1	Plasma-Ätzung	89
6.7.2	Pfropfkopolymerisation	90
6.8	Nachweis des Einwachsens <i>in vitro</i> & <i>in vivo</i>	91
6.9	Ausblick	92
7.	LITERATURVERZEICHNIS	93

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AFGF	a-Fibroblast Growth Factor
AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
APC	Antigen Presenting Cell (Antigenpräsentierende Zelle)
BDV	Bornea-Disease Virus
bFGF	b-Fibroblast Growth Factor
BME	Basal Eagles Medium
BSA	Bovines Serum Albumin
CD4	Cluster of Differentiation 4
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
d	Tage
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Dihydrochlorid
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonikleinsäure
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carboiimid-hydrochlorid
EGF	Epidermal Growth Factor
ELM	External Limiting Membrane (membrana limitans externa)
FCS	Fötales Kälberserum
FDA	1. Food and Drug Administration 2. Fluoreszeindiazetat
GABA	γ -Aminobutyrylsäure
GCL	Ganglion Cell Layer (Ganglienzellschicht)
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GHz	Gigahertz
h	Stunden
H₂O	Wasser
HRPO	Merettichperoxidase
HSPG	Heparin-Sulfat
ILM	Inner Limiting Membrane (<i>Membrana limitans interna</i>)
ILT	Fraunhofer Institut für Lasertechnik Aachen
INL	Inner Nuclear Layer (Innere Körnerzellschicht)
IOL	Intraokularlinse
IPL	Inner Plexiform Layer (Innere plexiforme Schicht)

KA	Kainic Acid
LIGA	Litografie-Galvanik-Abformung
MHC II	Major Histocompatibility Complex, Class II
Min	Minuten
Na₂HPO₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH₂PO₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
ONL	Outer Nuclear Layer (Äußere Körnerzellschicht)
OPL	Outer Plexiform Layer (Äußere plexiforme Schicht)
PAA	Polyakrylsäure
PATCH	Netzhautpflaster
PBS	Phosphat Buffered Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDMS	Poly-Di-Methyl-Siloxan
PI	Propidiumiodid
PVA	Polyvinylalkohol
RE	<i>Retina</i> -Encoder
REM	Raster-Elektronenmikroskopie
RF	Rezeptives Feld
RIG	<i>Retina</i> -Implantat-Gesamtsystem
RS	<i>Retina</i> -Stimulator
TCAB	Tissue Culture Adhesive System for Biomaterials
TEA	Tetraethylammonium
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
USA	United States of Amerika
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
z.Z.	zur Zeit
ZNS	Zentrales Nervensystem