

Netzhautgefäßpathologien in einem Rattenmodell  
für periventrikuläre Leukomalazie – ein neues Modell  
für die Frühgeborenenretinopathie beim Menschen?

---

**Janina Steck**

**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie

Betreuer: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

**und**

dem Labor für molekulare Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für  
Augenheilkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: PD Dr. Dr. Knut Stieger

### **Netzhautgefäßpathologien**

**in einem Rattenmodell für periventrikuläre Leukomalazie –  
ein neues Modell für die Frühgeborenenretinopathie beim Menschen?**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Janina Steck**

Tierärztin aus Memmingen

Gießen 2014

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Prof. Dr. Dr. Knut Stieger

Tag der Disputation: 14. Mai 2014

# Inhalt

1. Einleitung .....	1
1.1. Aufbau des Wirbeltierauges .....	1
1.2. Physiologische Angiogenese in der Retina von Nagern und Menschen .....	4
1.2.1. Angiogenese in der Nagerretina .....	4
1.2.1.1. Gliazellen .....	4
1.2.1.2. HIF1 $\alpha$ und VEGF-A .....	5
1.2.1.3. Gefäßschichten in der Nagerretina .....	7
1.2.1.4. Plexusentwicklung via Angiogenese .....	9
1.2.1.5. Vascular Remodeling .....	12
1.2.2. Angiogenese in der humanen Retina .....	14
1.3. Medizinische Sauerstoffversorgung menschlicher Frühgeborener und damit verbundene Probleme im Hinblick auf die ROP .....	16
1.4. Die Frühgeborenenretinopathie .....	18
1.4.1. Pathogenese .....	18
1.4.2. Klassifikation der ROP .....	20
1.4.3. Behandlungsmöglichkeiten .....	20
1.4.3.1. Prophylaxe .....	20
1.4.3.2. Frühgeborenen - Screening .....	21
1.4.3.3. Koagulationstherapie .....	21
1.4.3.4. Pharmakologische Therapie .....	22
1.5. Tiermodelle für ROP .....	23
1.5.1. OIR-Mausmodell nach Smith .....	24
1.5.1.1. Entwicklung des Modells .....	24
1.5.1.2. Experimentelles Design und Morphologie der Gefäßveränderungen im OIR – Mausmodell nach Smith .....	24
1.5.1.3. Pathomechanismus der Gefäßveränderungen und beteiligte Faktoren .....	27
1.5.1.4. Die Rolle der Astrozyten im OIR - Modell .....	29
1.5.2. ROP-Rattenmodell nach Penn .....	32
1.5.2.1. Entwicklung und experimentelles Design des ROP - Rattenmodells .....	32
1.5.2.2. Morphologie der Gefäßveränderungen .....	34
1.5.2.3. Pathomechanismus der Gefäßveränderungen .....	35
1.5.3. ROP - Katzen- /Hundemodell .....	36
1.5.3.1. Das ROP – Katzenmodell .....	36
1.5.3.2. Das ROP – Hundemodell .....	38
1.6. Die periventrikuläre Leukomalazie .....	40

1.7.	Ziel der Arbeit.....	44
2.	Material und Methoden .....	45
2.1.	Versuchsaufbau .....	45
2.2.	Materialien .....	48
2.2.1.	Arzneimittel .....	48
2.2.2.	Substanzen .....	48
2.2.3.	Puffer .....	50
2.2.4.	Verbrauchsmaterialien .....	51
2.2.5.	Antikörper.....	52
2.2.6.	Enzyme und Marker .....	53
2.2.7.	Primer .....	53
2.2.8.	Geräte.....	54
2.3.	Methoden .....	55
2.3.1.	In vivo Versuche.....	55
2.3.1.1.	Tiere.....	55
2.3.1.2.	Pharmakologische Interventionen .....	56
2.3.1.2.1.	Narkose/Anästhesie .....	56
2.3.1.2.2.	Antagonisierung .....	59
2.3.1.2.3.	Postoperative Analgesie.....	61
2.3.1.3.	Unilaterale Karotisligatur .....	62
2.3.1.4.	Hypoxie/Hyperoxie .....	63
2.3.1.5.	Angiographie.....	65
2.3.1.6.	Tiertötungen.....	67
2.3.1.6.1.	Dekapitation bzw. zervicale Dislokation.....	67
2.3.1.6.2.	PFA - Perfusion.....	68
2.3.1.7.	Augenentnahme und Augenpräparation.....	69
2.3.1.7.1.	Immunhistochemie .....	69
2.3.1.7.2.	Molekularbiologie .....	71
2.3.1.8.	Augenkonservierung und –lagerung.....	71
2.3.1.8.1.	Für Immunhistochemie.....	71
2.3.1.8.2.	Für Molekularbiologie .....	72
2.3.2.	In vitro Versuche .....	72
2.3.2.1.	Immunhistochemische Methoden.....	72
2.3.2.1.1.	Immunfluoreszenzfärbung <i>flatmount</i> .....	72
2.3.2.1.1.1.	Färbeprotokoll .....	74
2.3.2.1.1.2.	Eindeckeln kompletter Netzhäute.....	75

2.3.2.1.2. Gefäßanalysen .....	76
2.3.2.1.2.1. Expansion des tiefen Gefäßplexus .....	77
2.3.2.1.2.2. Durchmesser der großen Gefäße .....	78
2.3.2.1.2.3. Periarteriell gefäßfreie Bereiche (PGB) .....	79
2.3.2.1.2.4. <i>Branching Points</i> (BP) .....	80
2.3.2.1.2.5. Lokale Gefäßpathologien .....	81
2.3.2.1.3. Kryoschnitte .....	81
2.3.2.1.3.1. Herstellung von Kryoschnitten .....	81
2.3.2.1.3.2. Färbeprotokoll .....	82
2.3.2.2. Molekularbiologische Methoden .....	83
2.3.2.2.1. Ribonukleinsäure .....	83
2.3.2.2.1.1. RNA-Extraktion .....	84
2.3.2.2.1.2. RNA-Qualitätsnachweis .....	85
2.3.2.2.1.3. Reverse Transkription .....	86
2.3.2.2.2. Quantitative PCR .....	87
2.3.2.2.2.1. PCR-Protokoll .....	89
2.3.2.2.2.2. Berechnung des <i>fold change</i> mittels $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode .....	90
2.3.3. Statistik .....	92
2.3.3.1. Immunhistochemie .....	92
2.3.3.2. Molekularbiologie .....	92
3. Ergebnisse .....	93
3.1. Morphologische Analyse .....	93
3.1.1. Vaskularisierungsverlauf der Rattenretina auf <i>flatmount</i> -Präparaten .....	93
3.1.2. Fluoreszenz - Angiographie .....	94
3.1.3. Beschreibung des retinalen Gefäßsystems an P11 und P21 auf <i>flatmount</i> - Präparaten .....	100
3.1.4. Gefäßanalysen auf <i>flatmounts</i> .....	106
3.1.4.1. Expansion des tiefen Gefäßplexus .....	106
3.1.4.2. Durchmesser der großen Gefäße .....	110
3.1.4.2.1. Durchmesser der großen Arterien .....	111
3.1.4.2.1.1. Vergleich Interventionsgruppen mit Kontrollgruppe .....	111
3.1.4.2.1.2. Zeitlicher Entwicklungsverlauf (P11 vs. P21) .....	114
3.1.4.2.1.3. Räumlichen Entwicklungsverlauf (zentral vs. mittlere Peripherie) ..	115
3.1.4.2.2. Durchmesser der großen Venen .....	117
3.1.4.2.2.1. Vergleich Interventionsgruppen mit Kontrollgruppe .....	117
3.1.4.2.2.2. Zeitlicher Entwicklungsverlauf (P11 vs. P21) .....	118

3.1.4.2.2.3. Vergleich des räumlichen Entwicklungsverlaufs (zentral vs. mittlere Peripherie) .....	118
3.1.4.3. Periarteriell gefäßfreie Bereiche (PGB) .....	119
3.1.4.4. Branching Points .....	121
3.1.4.5. Lokale Gefäßpathologien .....	122
3.1.4.5.1. Neovaskuläre Tufts .....	124
3.1.4.5.2. Unvollständige Vaskularisation der retinalen Peripherie .....	126
3.1.4.5.3. Arterio – venöses Crossing .....	126
3.1.4.5.4. Vasokonstriktion und Dilatation .....	127
3.1.4.5.5. Tortuositas .....	127
3.1.4.5.6. Extravasate .....	128
3.1.4.6. GFAP-Expression .....	130
3.1.4.7. Ng2-Expression.....	133
3.2. Genexpressionsanalyse .....	135
3.2.1. RNA-Qualität .....	135
3.2.2. HIF1 $\alpha$ .....	137
3.2.3. VEGF-A 164.....	138
3.2.4. EpoR.....	139
3.2.5. TNF $\alpha$ .....	140
3.2.6. NOS-2.....	141
4. Diskussion.....	143
4.1. Interpretation morphologischer Veränderungen des retinalen Gefäßsystems im PVL-Rattenmodell .....	143
4.1.1. Leichte Veränderung des retinalen Gefäßsystems von A-R, B und C-R.....	143
4.1.2. Mäßige Veränderung des retinalen Gefäßsystems von A-L und C-L.....	146
4.1.3. Interpretation der morphologischen Gefäßveränderungen im PVL – Rattenmodell im Vergleich zu anderen ROP – Modellen .....	152
4.2. Interpretation der Genexpressionsveränderungen im PVL – Rattenmodell im Vergleich zu anderen ROP - Modellen .....	159
4.3. Korrelation von Schäden an Retina und Gehirn.....	162
4.4. Ausblick/mögliche Therapieansätze .....	163
5. Zusammenfassung.....	165
6. Summary.....	167
7. Datenanhang .....	168
8. Publikationen und Präsentationen .....	172
9. Literaturverzeichnis .....	173
10. Danksagung.....	182

11. Erklärung..... 183

# Abkürzungsverzeichnis

ACC: Arteria carotis communis  
ACE: Arteria carotis externa  
ACI: Arteria carotis interna  
Ang2: Angiopoietin 2  
APP: Arteria pterygopalatina  
ARDS: *acute respiratory distress syndrome*  
BMP9/10: *bone morphogenic protein 9/10*  
BP: *branching points*  
BPD: bronchiopulmonale Dysplasie  
BrdU: Bromdesoxyuridin  
CD18: *cluster of differentiation 18*  
CD45: *cluster of differentiation 45*  
CD68: *cluster of differentiation 68*  
cGD: zentraler Gefäßdurchmesser  
CT: *cycle threshold*  
ddH<sub>2</sub>O: doppelt destilliertes Wasser  
dH<sub>2</sub>O: destilliertes Wasser  
DII4: *delta-like ligand 4*  
DNA: *deoxyribonucleic acid*  
DR: diabetische Retinopathie  
EPO: *erythropoietin*  
EpoR: *erythropoietin receptor*  
FA: Fluoreszenz - Angiographie  
Fas-L: Fas-Ligand  
GCL: *ganglion cell layer*  
GD: Gefäßdurchmesser  
GFAP: *glial fibrillary acidic protein*  
GW: Gestationswoche  
HIF1 $\alpha$ : *Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$*   
HPRT: *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*  
HRE: *hypoxia response elements*

IGF: *insulin-like growth factor*  
ILM: *inner limiting membrane*  
INL: *inner nuclear layer*  
IPL: *inner plexiform layer*  
IS: *inner segments*  
KGW: Körpergewicht  
MBP: Myelin-Basis-Protein  
mpGD: Gefäßdurchmesser in der mittleren Peripherie  
MRT: Magnetresonanztomographie  
NFL: *nerve fiber layer*  
Nos2: *nitric oxide synthase 2 (inducible)* induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase  
NV: Neovaskularisation  
NV: Neovaskularisation  
OIR: *oxygen-induced retinopathy*  
OLM: *outer limiting membrane*  
ONL: *outer nuclear layer*  
OPL: *outer plexiform layer*  
OS: *outer segments*  
P: postnataler Tag  
PCR: *polymerase chain reaction*  
PDGFA/B: *platelet derived growth factor A/B*  
PDGFR $\alpha/\beta$ : *platelet derived growth factor receptor  $\alpha/\beta$*   
PEDF: *pigment epithelium derived factor*  
PEDFR: *pigment epithelium derived factor receptor*  
PFA: Paraformaldehyd  
PGB: periarteriell gefäßfreie Bereiche  
pO<sub>2</sub>: Sauerstoffpartialdruck  
PVL: periventrikuläre Leukomalazie  
RAS: Renin-Angiotensin-System  
RNA: *ribonucleic acid*  
ROP: *retinopathy of prematurity*  
ROS: *reactive oxygen species*  
RPE: *retinal pigment epithelium*  
RT: Raumtemperatur

SO: *supplemental oxygen*

SSW: Schwangerschaftswoche

Stabw: Standardabweichung

TGF $\beta$ : *transforming growth factor  $\beta$*

TNF $\alpha$ : *tumor necrosis factor  $\alpha$*

UCL: unilaterale Karotisligatur (*unilateral carotid ligation*)

VAA: vollständig antagonisierbare Anästhesie

VEGF: *vascular endothelial growth factor*

VEGFR1/2: *vascular endothelial growth factor receptor 1/2*

VK: Vasokonstriktion

VO: Vasoobliteration

ZNS: zentrales Nervensystem

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des Wirbeltierauges.....	2
Abbildung 2: Schichtung der Netzhaut .....	3
Abbildung 3 : Arteria carotis communis und ihre Äste .....	3
Abbildung 4: Aktivierung von HIF1 $\alpha$ .....	7
Abbildung 5: Gefäßschichten in der Mäuseretina .....	8
Abbildung 6: Gefäßschichten in der Rattenretina .....	9
Abbildung 7: Tip- und Stalk-Zellen.....	11
Abbildung 8: Wechselwirkungen in der Netzhaut .....	14
Abbildung 9: NFL und Gefäße einer humanen Netzhaut.....	15
Abbildung 10: Phasen der ROP .....	19
Abbildung 11: Experimentelles Setup für das OIR – Mausmodell .....	26
Abbildung 12: Fluoreszein-Dextran perfundierte OIR-Netzhäute.....	26
Abbildung 13: GFAP-Expression im OIR-Modell .....	31
Abbildung 14: ROP-Modell Sauerstoffregime .....	33
Abbildung 15: Klinischer Bezug des ROP-Modells .....	33
Abbildung 16: FITC-dextran perfundierte Netzhäute des ROP-Rattenmodells.....	35
Abbildung 17: ROP-Katzenmodell .....	38
Abbildung 18: ADPase gefärbte Hundenetzhäute, P5.....	40
Abbildung 19: Periventrikuläre Leukomalazie .....	43
Abbildung 20: Zeitlicher Ablauf eines Tierversuchs .....	47
Abbildung 21: Intraperitonäale Injektion bei einer sechs Tage alten Ratte .....	57
Abbildung 22: Unilaterale Karotisligatur an P6 .....	63
Abbildung 23: Hypoxie/Hyperoxie-Intervention.....	65
Abbildung 24: Fluoreszenzangiographie .....	67
Abbildung 25: PFA-Perfusion .....	68
Abbildung 26: Isolation der Neuroretina aus einem 11 Tage alten Rattenauge .....	70
Abbildung 27: Präparation eines flatmounts .....	76
Abbildung 28: Expansionsmessung des tiefen Gefäßplexus .....	77
Abbildung 29: Gefäßdurchmesser großer retinaler Arterien und Venen .....	78
Abbildung 30: Bestimmung von PGB und GD, P11 .....	79
Abbildung 31: Quantifizierung der BP, P11 .....	80
Abbildung 32: Vaskularisierungsverlauf der gesunden Rattennetzhaut.....	94
Abbildung 33: Korrelation Angiographie - <i>flatmount</i> , P11 .....	96
Abbildung 34: Korrelation Angiographie - <i>flatmount</i> , P21 .....	97
Abbildung 35: Korrelierende Darstellung retinaler Extravasationen.....	99
Abbildung 36: Beteiligung von Mikroglia an der Angiogenese .....	101
Abbildung 37: Beispielhafte Darstellung der Versuchsnetzhäute an P11 .....	103
Abbildung 38: Beispielhafte Darstellung der Versuchsnetzhäute an P21 .....	105
Abbildung 39: Expansion des tiefen Gefäßplexus an P11 und P21.....	108
Abbildung 40: Korrelation der Plexusexpansion auf <i>flatmount</i> und Kryoschnitt.....	110
Abbildung 41: Abweichungen im arteriellen Gefäßdurchmesser .....	113
Abbildung 42: Zeitlicher Entwicklungsverlauf des arteriellen GD.....	115

Abbildung 43: Räumlicher Entwicklungsverlauf des arteriellen GD .....	117
Abbildung 44: Quotient aus PGB und GD, P11 .....	120
Abbildung 45: Branching Points pro mm <sup>2</sup> , P11 .....	122
Abbildung 46: Lokale Gefäßpathologien.....	123
Abbildung 47: Neovaskuläre Tufts.....	125
Abbildung 48: Lokale Gefäßpathologien.....	128
Abbildung 49: Extravasate.....	129
Abbildung 50: GFAP-Expression und Gefäßwachstum .....	131
Abbildung 51: GFAP-Expression im Bereich neovaskulärer Tufts.....	132
Abbildung 52: Ng2-Expression im Bereich neovaskulärer Tufts .....	134
Abbildung 53: Nachweis der RNA-Qualität.....	136
Abbildung 54: Expressionslevel von HIF1 $\alpha$ .....	137
Abbildung 55: Expressionslevel von VEGF-A 164.....	138
Abbildung 56: Expressionslevel von EpoR .....	139
Abbildung 57: Expressionslevel von TNF $\alpha$ .....	140
Abbildung 58: Expressionslevel von NOS-2 .....	141
Abbildung 59: Vergleichende Darstellung von 50/10-, 75- und Kontrollretinae.....	158

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungen für Interventionsgruppen .....	46
Tabelle 2: Narkotika, Medikamente, Injektionslösungen, Desinfektion .....	48
Tabelle 3: Substanzen für Immunfluoreszenz.....	48
Tabelle 4: Block- und Inkubationslösung für <i>flatmount</i> -Färbungen.....	49
Tabelle 5: Block- und Inkubationslösung für Gefrierschnitt-Färbungen .....	49
Tabelle 6: Substanzen für RNA-Extraktion, Reverse Transkription und PCR.....	50
Tabelle 7: Puffer .....	50
Tabelle 8: Chemikalien zur Pufferherstellung .....	51
Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien .....	52
Tabelle 10: Antikörper und Lektine .....	52
Tabelle 11: Enzyme und Marker.....	53
Tabelle 12: Primersequenzen.....	53
Tabelle 13: Geräte.....	55
Tabelle 14: Dosierung VAA pro 10g KGW.....	57
Tabelle 15: Verdünnung VAA pro 10g KGW.....	58
Tabelle 16: Dosierung VAA - Antagonisierung pro 10g .....	59
Tabelle 17: Verdünnung VAA - Antagonisierung pro 10g .....	60
Tabelle 18: Dosierung Metamizol pro 10g KGW.....	61
Tabelle 19: Verdünnung Metamizol pro 10g KGW .....	62
Tabelle 20: Reaktionsbedingungen für quantitative PCR .....	89
Tabelle 21: Mastermix für einen 10µl Probenansatz (n = 1) .....	90
Tabelle 22: Lokale Gefäßpathologien.....	123
Tabelle 23: Vergleich PVL-Rattenmodell - gängige OIR-/ROP-Modelle .....	154
Tabelle 24: Relative Expansion des tiefen Gefäßplexus .....	168
Tabelle 25: Reduktion des tiefen Gefäßplexus.....	168
Tabelle 26: Korrelation von <i>flatmounts</i> und Kryoschnitten.....	168
Tabelle 27: Arteriendurchmesser, Abweichungen von Kontrollgruppe, P11 .....	168
Tabelle 28: Arteriendurchmesser, Abweichungen von Kontrollgruppe, P21 .....	168
Tabelle 29: Arteriendurchmesser, zeitl. Entwicklungsverlauf, zentrale Retina.....	169
Tabelle 30: Arteriendurchmesser, zeitlicher Entwicklungsverlauf, mp Retina.....	169
Tabelle 31: Arteriendurchmesser, räumlicher Entwicklungsverlauf, P11 .....	169
Tabelle 32: Arteriendurchmesser, räumlicher Entwicklungsverlauf, P21 .....	169
Tabelle 33: Quotient PGB/GD, P11 .....	169
Tabelle 34: Anzahl BP/1mm <sup>2</sup> , P11.....	170
Tabelle 35: Fold Change Werte für HIF1 $\alpha$ .....	170
Tabelle 36: Fold Change Werte für VEGF .....	170
Tabelle 37: Fold Change Werte für EpoR.....	171
Tabelle 38: Fold Change Werte für TNF $\alpha$ .....	171
Tabelle 39: Fold Change Werte für Nos2 .....	171

## Hinführung

Im Rahmen einer Forschungs Kooperation der Augenklinik Gießen mit der Kinderklinik Marburg wurde ein Rattenmodell für die periventriculäre Leukomalazie (PVL) etabliert. In der vorliegenden Arbeit wurden dabei (neben der Untersuchung der Gehirne durch die Marburger Gruppe) die Augen der Tiere im Hinblick auf Gefäßveränderungen im Sinne einer Frühgeborenenretinopathie (ROP) analysiert. Da beide Erkrankungen im Rahmen schwankender Sauerstoffversorgung während der Geburt und der Nachsorge bei frühgeborenen Babys auftreten, wurde bei den neonatalen Tieren eine einseitige Ischämie im Kopfbereich erzeugt und sie wurden temporär wechselnden Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt. Die Augen wurden dann zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Intervention *in vivo* befundet, danach entnommen und die Netzhäute immunhistochemisch und molekularbiologisch untersucht. Die Analyse der Retinae ergab moderate Gefäßveränderungen im Hinblick auf die Frühgeborenenretinopathie sowie eine deutlich verzögerte Gefäßreifung in allen Versuchsnetzhäuten. Die gefundenen Ergebnisse weisen großen klinischen Bezug auf, da nun gerade die häufig vorkommenden, mäßig schweren ROP-Fälle in menschlichen Frühgeborenen gut untersucht und Behandlungsstrategien optimiert werden können. Zusätzlich kann das Modell auch zur Forschung am *vascular remodeling* eingesetzt werden und ist außerdem die erste Studie, in der langfristig eine Korrelation von Augen- und Gehirnveränderungen im Hinblick auf ROP und PVL möglich sein wird.

# 1. Einleitung

## 1.1. Aufbau des Wirbeltierauges

Das Auge der Wirbeltiere sitzt, eingebettet von Fett- und Bindegewebe, in der knöchernen Orbita. Zur Bewegung des Augapfels befähigen das Tier drei Muskelpaare, die außen am Augapfel ansetzen und so eine Rotation ermöglichen.

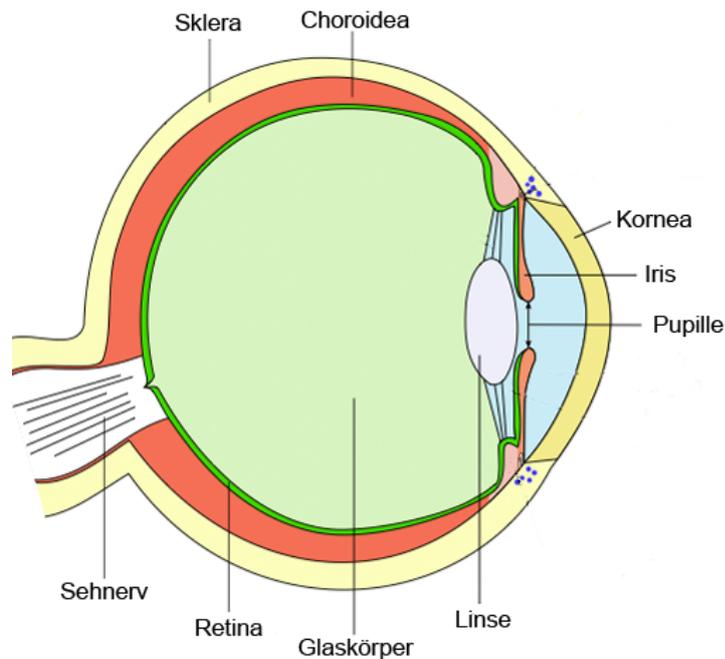
Das Auge als Hohlkörper ist von einer dreischichtigen Schale, der Uvea, umgeben, der innere Hohlraum wird vom Glaskörper ausgefüllt (Abbildung 1). Die äußerste Schicht der Uvea, die Sklera oder Lederhaut, enthält hauptsächlich Bindegewebsfasern, welche ihr eine derbe Konsistenz verleihen. Sie trägt maßgeblich zur Formerhaltung und zum Schutz des Auges bei und stellt die Verbindung zur Dura Mater des zentralen Nervensystems her [<http://webvision.med.utah.edu/book/part-i-foundations/gross-anatomy-of-the-ey/>].

Im anterioren Teil des Auges geht die Sklera am sog. Limbus in die Kornea, Hornhaut, über. Sie besteht aus Kollagenfasern und Keratinozyten und enthält keine Blutgefäße. Zahlreiche Nervenfasern stellen höchste Sensitivität gegenüber äußeren Einflüssen sicher, sodass das Auge im Gefahrenfall schnell geschlossen werden kann.

Die Choroidea, Aderhaut, ist die mittlere Schicht der Uvea und gewährleistet durch ihren hohen Gefäßanteil im Wesentlichen die Blutversorgung der äußeren Netzhautschichten.

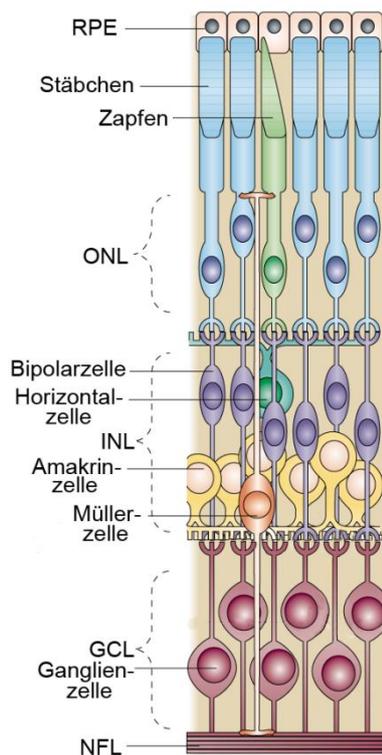
Am Limbus geht die Choroidea in die Iris, Regenbogenhaut über, die aus fibrovaskulären Fasern und einer pigmentierten Epithelschicht besteht. Sie regelt den Durchmesser der Pupille. Hinter der Pupille befindet sich, an den sog. Zonulafasern des Ziliarkörpers der Iris aufgehängt, die Linse.

Die Retina, Netzhaut, ist die innerste Schicht des Bulbus, sie besteht selbst aus wiederum sieben Schichten verschiedener Nervenzellen. Sie kleidet den Augenbecher als innerste Schicht im posterioren Augenteil aus und geht im anterioren Teil, an der sog. *Ora serrata*, von der sehenden *Pars optica* in die blinde *Pars caeca* über, welche dann den Ziliarkörper und die Iris bedeckt [1].



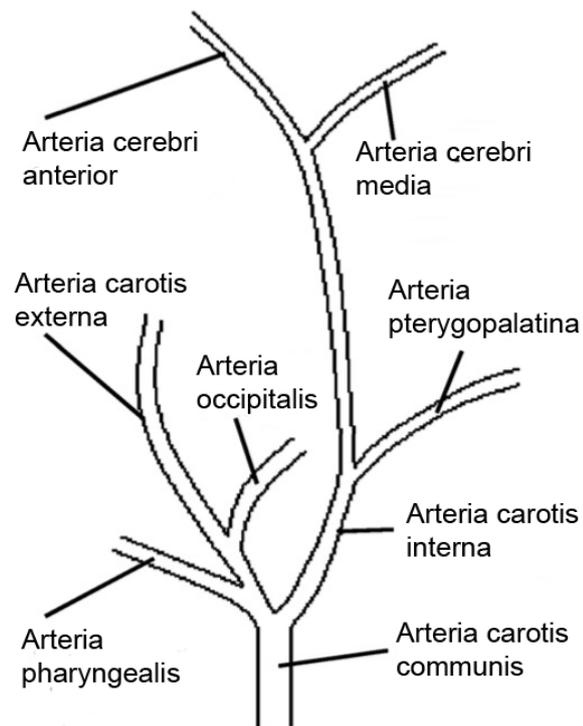
**Abbildung 1: Aufbau des Wirbeltierauges**  
modifiziert nach Talos

Zwischen der Netzhaut und der Aderhaut liegt das RPE (*retinal pigment epithelium*). Nach innen folgen die äußeren (OS – *outer segments*) sowie inneren (IS – *inner segments*) Segmente der Photorezeptoren, bei welchen man zwischen Stäbchen und Zapfen unterscheidet. Die äußere Körnerschicht (ONL – *outer nuclear layer*) wird von den Zellkörpern der Photorezeptoren gebildet, die darauf folgende äußere plexiforme Schicht (OPL – *outer plexiform layer*) kennzeichnet die synaptischen Verschaltungen zwischen Photorezeptoren und Horizontal-, Bipolar- und Amakrinzellen. In der inneren Körnerschicht (INL – *inner nuclear layer*) befinden sich die Zellkerne der Horizontal-, Bipolar- und Amakrinzellen, deren Axone in der inneren plexiformen Schicht (IPL – *inner plexiform layer*) mit den Fortsätzen der Ganglienzellen verschaltet sind. Die Ganglienzellschicht (GCL – *ganglion cell layer*) beherbergt die Zellkörper der Ganglienzellen (Abbildung 2). Die Axone der Ganglienzellen bilden als ein dichtes Netzwerk die innerste Schicht der Retina (NFL – *nerve fiber layer*) und vereinigen sich zentral zum optischen Nerv. Die Netzhaut wird nach innen und nach außen durch die sog. innere (ILM) bzw. äußere (OLM) limitierende Membran begrenzt [1].



**Abbildung 2: Schichtung der Netzhaut**

RPE: *retinal pigment epithelium*, ONL: *outer nuclear layer*, INL: *inner nuclear layer*, GCL: *ganglion cell layer*, NFL: *nerve fiber layer*, modifiziert nach Dyer et al. [2]



**Abbildung 3 : Arteria carotis communis und ihre Äste**

modifiziert nach Ogishima 2011

Die Blutgefäßversorgung der Retina erfolgt gänzlich über die Arteria carotis communis (ACC), diese gibt als Arteria carotis interna (ACI) die Arteria choroidea ab, um die äußeren Netzhautschichten zu versorgen. Weiterhin entspringt bei Nagern aus der ACI die Arteria pterygopalatina (APP), welche über Arteria ophthalmica und Arteria centralis retinae die inneren Netzhautschichten supplementieren [3] [4] [5] (Abbildung 3).

## **1.2. Physiologische Angiogenese in der Retina von Nagern und Menschen**

### **1.2.1. Angiogenese in der Nagerretina**

Zum Zeitpunkt der Geburt verfügt die Netzhaut von Nagetieren über kein eigenes Gefäßsystem, sondern wird durch die noch aus der embryonalen Entwicklung vorhandenen, hyaloiden Gefäße mit Blut versorgt. Diese durchziehen den Glaskörper und erhalten arterielles Blut von der Arteria hyaloidea, während der Abfluss des venösen Blutes über die Aderhaut erfolgt. Nach der Geburt kommt es durch Beteiligung von Makrophagen zur Regression der Glaskörpergefäße, gleichzeitig beginnt die Entwicklung des retinalen Gefäßsystems [6].

#### **1.2.1.1. Gliazellen**

Als Voraussetzung für ein physiologisches Gefäßwachstum in der Netzhaut ist das Mitwirken der retinalen Gliazellen entscheidend. Innerhalb dieser Zellgruppe können zwei Subpopulationen unterschieden werden:

Bei der sog. Mikroglia handelt es um Immunzellen des ZNS. Sie sind hämatopoetischen Ursprungs und wandern teils noch vor der Gefäßentwicklung [7] [8] in die Netzhaut ein und bleiben dort ansässig [9]. Charakteristische Antigene dieser Zellen sind F4/80, anti-CD45 und anti-CD68 [8]. Ihre Verteilung ist dabei abhängig vom Entwicklungsstadium, so finden sie sich in der neonatalen Retina vor allem in der ganz innen liegenden Nervenfaserschicht und der Ganglienzellschicht [7], während sich die Mikrogliazellen in der adulten Mäusenetzhaut mehr in äußeren Retinaschichten aufhalten [8]. Durch ihre Lokalisation ist eine Beteiligung dieser Zellen an Gefäßentwicklung und -reifung [10] und vor allem an Gefäßpathologien wie Neovaskularisationen (NV) und ebenso an deren Beseitigung [9] unumstritten. Ähnlich wie Makrophagen sind sie an zellulären Aufräumarbeiten, z.B. nach Verletzung der Retina, Apoptose von Endothelzellen und Immunreaktionen beteiligt [8].

Weitaus bedeutender ist jedoch die zweite Untergruppe der retinalen Gliazellen, die Makroglia. Hierzu gehören Müller-Zellen und retinale Astrozyten. Makrogliazellen üben grundsätzlich eine schützende und versorgende Funktion für die Gefäße aus

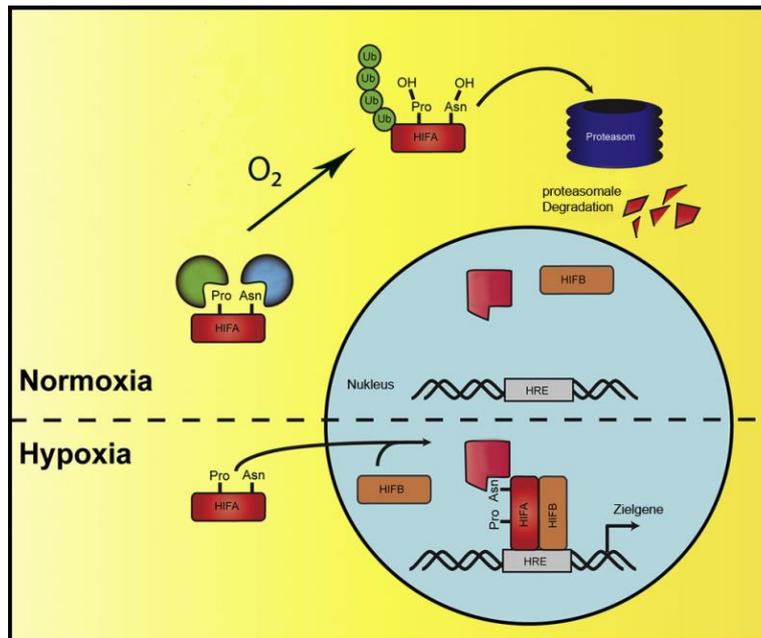
und sind substantiell an der Gefäßentwicklung und –erhaltung beteiligt [11]. Bei Müller-Zellen handelt es sich um Stützzellen der Netzhaut, die mit ihrem Zellkörper die gesamte Netzhaut durchziehen und mit ihren Endfortsätzen die OLM sowie die ILM bilden. Sie wirken strukturerhaltend und sind für die metabolische Versorgung von Endothelzellen und zahlreichen anderen Zellarten der Retina verantwortlich [12]. Bei der für die Gefäßentwicklung bedeutendsten Makroglia handelt es sich um die retinalen Astrozyten. Sie entwickeln sich aus Astrozyten-Vorläuferzellen im Sehnerv und wandern kurz vor den Gefäßen in die Retina ein, um diese mit ihrem Netzwerk zu bedecken [6]. Sie erreichen die retinale Peripherie etwa zum Zeitpunkt der Geburt [13]. Unreife, proliferierende Astrozyten weisen dabei eine spindelzellartige Morphologie auf [14] und exprimieren hauptsächlich Vimentin [15] und wenig GFAP (*glial fibrillary acidic protein*). Beide Proteine sind in den Intermediärfilamenten der retinalen Gliazellen zu finden. Im Laufe der Maturation kehrt sich dieses Verhältnis um, sodass reife Astrozyten mit Antikörpern gegen GFAP zu identifizieren sind [6] [15] [16]. Schon 1996 konnte von Fruttiger et al. gezeigt werden, dass Astrozyten außerdem Rezeptoren für PDGFA (PDGFR $\alpha$ ) (*platelet derived growth factor A* bzw. *platelet derived growth factor receptor  $\alpha$* ) exprimieren und in ihrem Wachstum von retinalen Ganglienzellen und deren PDGFA-Ausschüttung parakrin gesteuert werden. Diese hierarchische und zeitlich versetzte Zellentwicklungskaskade setzt sich auch später zwischen Astrozyten und Gefäßen fort. So wird sichergestellt, dass sich die Zellpopulationen in Abhängigkeit voneinander entwickeln und in ihrer Quantität genau aufeinander abgestimmt sind [17]. Im Rahmen der Astrozytenreifung erlangen die Zellen ihre typische sternförmige Morphologie [14] und es kommt zu einer Zunahme der GFAP [18] [15] und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) [19] [6] Expression. GFAP wird ausschließlich in Astrozyten und aktivierten Müller-Zellen exprimiert [20].

#### **1.2.1.2. HIF1 $\alpha$ und VEGF-A**

Durch Proliferation und steigenden Sauerstoffbedarf der Astrozyten kommt es in der noch nicht vaskularisierten Netzhaut zu einer physiologischen Gewebshypoxie. Die Astrozyten beginnen als Reaktion auf die Hypoxie mit der Ausschüttung von VEGF, welches der wichtigste stimulierende Faktor für das Gefäßwachstum ist [19]. Es

existieren sieben VEGF-Varianten, wobei VEGF-A mit seiner Wirkung auf Endothelzellen (siehe unten) als entscheidender und wichtigster Wachstumsfaktor für die retinale Angiogenese fungiert. Bei VEGF-A handelt es sich um ein 34 – 42 kDa großes, dimeres Glykoprotein, dessen zwei Aminosäureketten über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Die Größe ist dabei abhängig von der Anzahl der angehängten Aminosäuren [21]. Isoformen von VEGF-A, die im Rahmen der Angiogenese eine Rolle spielen, sind vor allem VEGF-A164 (wenig diffusionsfähig, wird von Astrozyten sezerniert, bleibt dann in unmittelbarer Nähe der Astrozyten und kann so direkt auf die Endothelzellen wirken), VEGF-A188 (nicht diffusionsfähig, wird von Astrozyten sezerniert und bindet an Oberflächen von Endothelzellen) und VEGF-A120 (diffusionsfähig) [13]. Die Expression von VEGF steht in Zusammenhang mit einem anderen Wachstumsfaktor: IGF-1 (*insuline-like growth factor*). IGF-1 wirkt dabei, genau wie VEGF, pro-angiogen und ist somit in der ersten ROP-Phase erniedrigt und in der zweiten Phase erhöht. Laut Heckmann et al. übt IGF-1 eine permissive Funktion für VEGF aus, sodass sich die angiogene Wirkung dieser beiden Faktoren erst in Kombination entfalten kann [22].

Die VEGF-Expression ist eng gekoppelt an die Aktivierung eines bedeutenden Transkriptionsfaktors: *hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$*  (HIF1 $\alpha$ ) als Master-Regulator der Genexpression unter hypoxischen Zuständen. HIF1 $\alpha$  ist Bestandteil des heterodimeren Proteins HIF1, welches aus den beiden Untereinheiten HIF1 $\alpha$  und HIF1 $\beta$  besteht. Unter normoxischen Bedingungen werden HIF1 $\alpha$  (im Zytoplasma) und HIF1 $\beta$  (im Zellkern) konstitutiv exprimiert. HIF1 $\beta$  bleibt stabil erhalten, während HIF1 $\alpha$  durch Ubiquitylierung direkt markiert und im Proteasom degradiert wird [21]. Unter hypoxischen Bedingungen jedoch bleibt die Ubiquitylierung von HIF1 $\alpha$  aus, dieses bleibt somit stabil und wird in den Zellkern transloziert. Dort kommt es zur Heterodimerisierung mit HIF1 $\beta$  und anderen Co-Aktivatoren. Der gesamte Komplex bindet schließlich an sog. HREs (*hypoxia response elements*) auf der DNA, welche angiogenen Target-Genen wie VEGF oder EPO vorgeschaltet sind (siehe Abbildung 4) [23].



**Abbildung 4: Aktivierung von HIF1 $\alpha$**

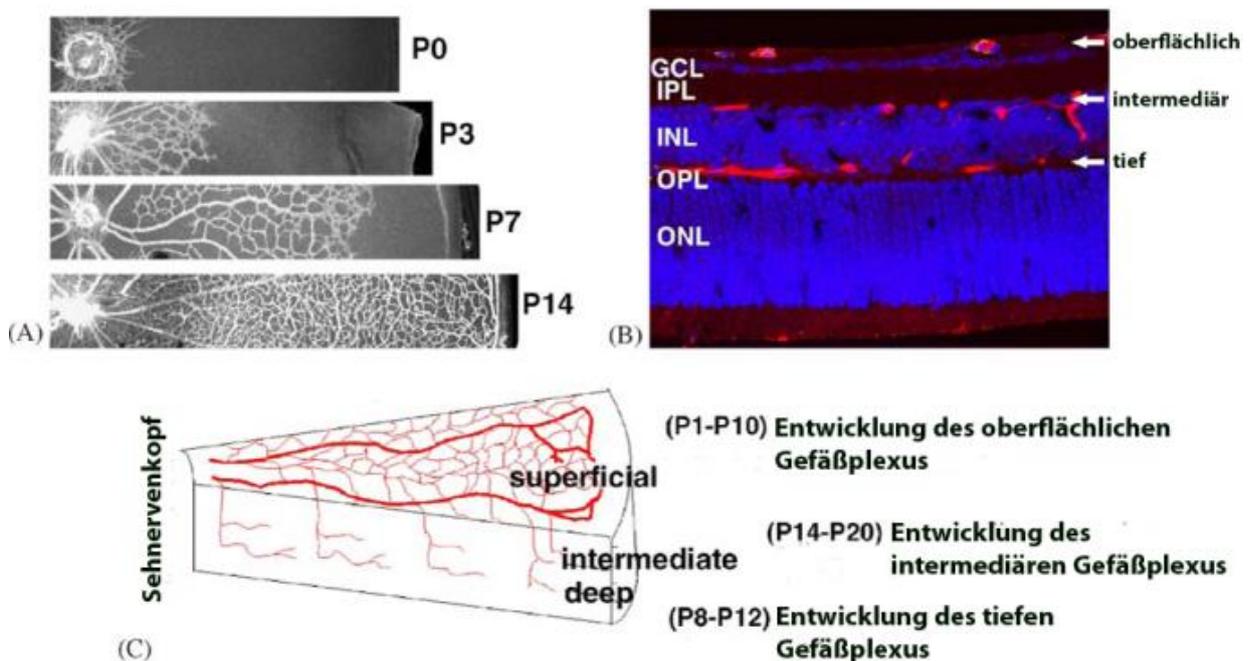
Erklärung: siehe Text; HIF: *hypoxia inducible factor*, Ub: *ubiquitin*, HRE: *hypoxia response element*, Pro: *proline*, Asn: *asparagine*; modifiziert nach Caprara 2012

### 1.2.1.3. Gefäßschichten in der Nagernetzhaut

In der Netzhaut von Mäusen werden drei [6] [24] (siehe Abbildung 5), in der Netzhaut von Ratten zwei [19] [25] [23] (siehe Abbildung 6) Gefäßschichten unterschieden, die in der postnatalen Entwicklung nacheinander konzentrisch über die Retina auswachsen. Man spricht vom oberflächlichen oder superfiziellen, vom intermediären und vom tiefen Gefäßplexus [24]. Der oberflächliche Plexus wächst dabei auf der innersten Schicht der Netzhaut mit den Astrozyten (und der NFL) als Unterlage [24]. Das Gefäßwachstum startet an P1 durch Sprossungsvorgänge von einem ringförmigen, um den optischen Nerv geschlungenen Gefäß aus [14], welches aus der Arteria retinalis entspringt [24]. In der Mäuseretina hat die vaskuläre Front der oberflächlichen Gefäßschicht, immer geleitet durch die VEGF-Ausschüttung der Astrozyten, an Lebenstag P4 in etwa die Hälfte und an P7 die Peripherie der Retina erreicht [14], wobei hier in Abhängigkeit von der Mauslinie geringfügige Unterschiede zu verzeichnen sind [26]. Die Formation der tiefen Gefäßschicht, welche sich in der äußeren plexiformen Schicht entwickelt, dauert ca. von P7 bis P12, während die intermediäre Gefäßschicht (in der inneren plexiformen Schicht) sich zwischen P12

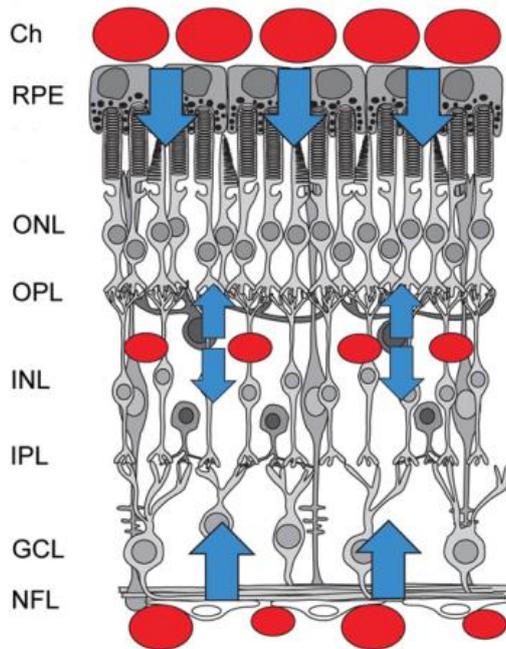
und P15 bildet. Im Alter von drei Wochen ist die retinale Gefäßentwicklung bei der Maus vollständig abgeschlossen [24].

Die Gefäßentwicklung in der Rattenretina verläuft zeitlich etwas nach hinten versetzt. Hier erreicht die primäre, superfizielle Gefäßschicht erst ca. an P12 die äußeren Ränder der Netzhaut. Die vaskulären Sprouts des tiefen Plexus (äußere plexiforme Schicht) erreichen die retinale Peripherie ca. an P14. Während des Wachstums kommt es hier außerdem zu ersten Gefäßdifferenzierungen zu Arterien, Venen und Kapillaren [19]. Das Wachsen der Gefäße über die Astrozyten führt auch in den Gliazellen selbst zu Reifungsvorgängen. Sie entwickeln nun erst ihre endgültige Morphologie und Expressionsmuster, bei dem die Vimentinausschüttung heruntergefahren und die GFAP Ausschüttung erhöht wird [18, 27] [6].



**Abbildung 5: Gefäßschichten in der Mäuseretina**

(A) Isolectin B4 gefärbte Netzhäute an P0, P3, P7, P14 (B) Immunfluoreszenzfärbung eines Querschnitts durch die Retina; blau: DAPI, rot: Isolectin B4 (C) Schematische Darstellung der drei Gefäßschichten mit Entwicklungszeiträumen; P: *postnatal day*, ONL: *outer nuclear layer*, OPL: *outer plexiform layer*, INL: *inner nuclear layer*, IPL: *inner plexiform layer*, GCL: *ganglion cell layer*; modifiziert nach Dorrell 2006



**Abbildung 6: Gefäßschichten in der Rattenretina**

Ch: Choroidea, RPE: *retinal pigment epithelium*, ONL: *outer nuclear layer*, OPL: *outer plexiform layer*, INL: *inner nuclear layer*, IPL: *inner plexiform layer*, GCL: *ganglion cell layer*, NFL: *nerve fiber layer*, rot schematisch: Gefäße, blau schematisch: Sauerstoffdiffusion; modifiziert nach Caprara 2012

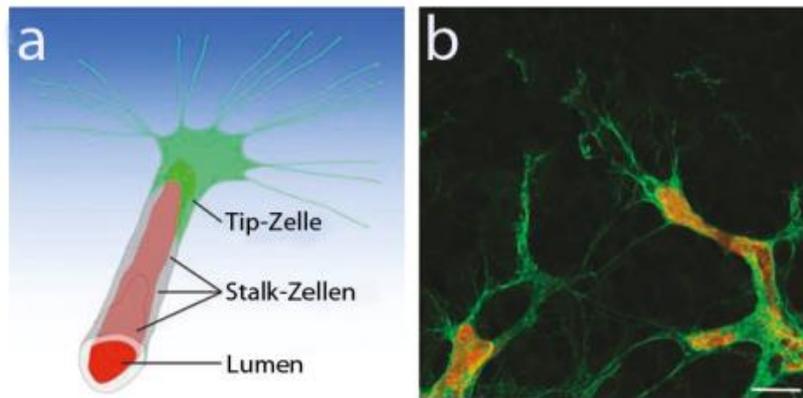
#### 1.2.1.4. Plexusentwicklung via Angiogenese

Herrschte bis Ende der 90er Jahre noch Uneinigkeit darüber, ob der superfizielle Gefäßplexus in der Nagerretina durch Vaskulogenese oder Angiogenese entsteht, so konnte im Jahre 2001 eindrucksvoll von Marcus Fruttiger gezeigt werden, dass es sich um einen angiogenetischen Vorgang handelt [14]. Der wesentliche Unterschied zwischen Vaskulogenese und Angiogenese besteht in der Beteiligung bzw. nicht Beteiligung von endothelialen Vorläuferzellen, den Angioblasten. Im Rahmen der Vaskulogenese entstehen dabei Gefäße *de novo*, d. h. Angioblasten wandern an ihren Bestimmungsort aus und differenzieren dort zu reifen Endothelzellen aus. Die Endothelzellen verschmelzen miteinander und formen so letztlich das neue Gefäß [14]. An dem Vorgang der Angiogenese hingegen sind keine Angioblasten beteiligt. Aus einem präexistenten Gefäß wachsen proliferierende Endothelzellen aus (*sprouting*) und bilden so in direktem Kontakt mit dem Herkunftsgefäß einen neuen Gefäßspross [14]. Innerhalb des neu ausgewachsenen Sprosses organisieren sich die Zellen zu einem Schlauch mit Lumen (*tube formation*), der sich dann weiter verzweigt (*branching*). Als letzter Schritt folgt die Anastomosenbildung der einzelnen

Gefäßzweige (*anastomosis*) [28]. Fruttiger konnte mit Hilfe des Endothelzellmarkers VEGFR1 (*vascular endothelial growth factor receptor 1*) und des Endothelzell- und Angioblastenmarkers VEGFR2 nachweisen, dass an der Entwicklung des retinalen Gefäßsystems keine Angioblasten, sondern nur reife Endothelzellen (und mit PDGFR $\alpha$  markierte Astrozyten) beteiligt sind [14].

Um den genauen Vorgang der Angiogenese verstehen zu können, muss man jedoch noch weiter ins Detail gehen. Unter einem äußerst komplexen Zusammenspiel von VEGF und seinen Rezeptoren und Liganden bzw. Rezeptoren des Notch-Signalwegs entwickeln sich an der vaskulären Front zwei verschiedene Zellarten: sog. Tip-Zellen und Stalk-Zellen (Abbildung 7). Diese konnten in besonders detaillierten Untersuchungen von Gerhardt et al. 2003 genau charakterisiert werden [29]. Bei der Tip-Zelle handelt es sich um eine hochspezialisierte Endothelzelle, welche mittels langer Filopodien ihre Umgebung chemisch abtastet. Die Filopodien reagieren mittels ihres VEGFR2 äußerst sensibel auf den in der Netzhaut vorhandenen VEGF-A-Gradienten (höhere VEGF-A Konzentration in der noch hypoxischen, peripheren Retina) und stehen in ständigem Kontakt mit den darunterliegenden Astrozyten, um die optimale Lokalisation für den neu entstehenden Gefäßspröss zu detektieren. In der genannten Arbeit konnte mittels des Proliferationsmarkers Ki-67 außerdem gezeigt werden, dass in der Tip-Zelle keine Proliferation stattfindet, sondern der weitere Weg des Triebs von ihr durch aktive Bewegung der Filopodien vorgegeben wird.

Die Stalk-Zellen sitzen, wie auf Abbildung 7 zu sehen, direkt hinter der Tip-Zelle im wachsenden Gefäß. Auch bei ihnen handelt es sich um Endothelzellen, die jedoch aufgrund ihres Expressionsprofils (im Gegensatz zu Tip-Zellen keine Expression von PDGF- $\beta$ ) von den Tip-Zellen abzugrenzen sind. Durch Ki-67 und BrdU-Färbungen konnte in den Stalk-Zellen eine deutliche Proliferation nachgewiesen werden, die durch hohe Konzentrationen von VEGF-A via VEGFR2 vermittelt wird. Die Astrozyten exprimieren eine Mischung aus VEGF-A164 und VEGF-A188, wobei für die Migration der Tip- bzw. die Proliferation der Stalk-Zellen weniger die Isoform, als mehr der VEGF-A-Gradient und -Konzentrationsmuster die entscheidende Rolle spielen [29].



**Abbildung 7: Tip- und Stalk-Zellen**

(a) Schematische - und (b) Immunfluoreszenz-Darstellung von Tip- (grün) und Stalk-Zellen bzw. Perfusion (rot); modifiziert nach Gerhardt 2003

Ist die Expansion des superfiziellen Gefäßplexus abgeschlossen, so beginnt die Entwicklung des tiefen Plexus durch vaskuläres Sprouting. Bei der Maus kommt zusätzlich und zeitlich etwas nach hinten versetzt auch die Entwicklung der intermediären Gefäßschicht hinzu. Dieser Prozess startet ebenfalls in der zentralen Retina und breitet sich zur Peripherie hin aus [6]. Dabei wachsen, ausgehend von venösen Gefäßen und Kapillaren des oberflächlichen Plexus, Gefäßsprosse vertikal in die tieferen Schichten der Netzhaut [30] aus und erreichen schließlich die innere Körnerschicht, an deren äußeren Rand sich durch Anastomosenbildung der tiefe oder sekundäre Gefäßplexus ausbildet [6] [13] [24]. Im Detail findet man diesen tiefen Plexus in der Mäuseretina zwischen der inneren Körnerschicht und der äußeren plexiformen Schicht, während der intermediäre Plexus sich zwischen innerer plexiformer Schicht und innerer Körnerschicht befindet [24]. Die Entwicklung dieser beiden Gefäßschichten geht schneller vonstatten als die des superfiziellen Plexus. Die Entwicklung des tiefen Plexus startet ca. an P9 und ist ca. an P12 abgeschlossen, wenn die retinale Peripherie erreicht ist [24]. Ist die tiefe Gefäßschicht der Mäuseretina komplettiert, so folgt ab etwa P12 die Entwicklung der intermediären Schicht, die ebenfalls durch vaskuläres Sprouting vom superfiziellen Plexus aus entsteht. Die Sprouts ändern beim Erreichen des inneren Randes der INL (zwischen IPL und INL) ihre Wachstumsrichtung von vertikal nach horizontal. Sie erreichen die Peripherie der Netzhaut ca. an P17 [24] [31].

Die vertikal wachsenden Gefäßsprosse orientieren sich am räumlichen Muster physiologischer Gewebshypoxie, das durch die entwicklungsbedingte Verdickung der äußeren retinalen Schichten zustande kommt. Die Zellen der INL werden durch die

Hypoxie zur Ausschüttung von VEGF veranlasst, was den Stimulus für das vertikale vaskuläre Sprouting und somit die Entwicklung der tieferen Gefäßschichten darstellt [19]. Bei ihrem Wachstum benutzen die proliferierenden Endothelzellen Müller-Zellen als Straßen, um die retinalen Schichten zu durchdringen [13].

Nachdem das Auswachsen aller drei Gefäßschichten in der Mäuseretina abgeschlossen ist, finden im Anschluss aufwendige Reifungs- und Umbauprozesse statt, die schließlich erst zur Bildung des maturierten Gefäßbaumes führen [6]. Die endgültige Gefäßentwicklung ist deshalb erst mit ca. 21 – 25 Tagen *post natum* abgeschlossen [24].

Die Netzhaut der Ratte verfügt, wie oben schon erwähnt, nur über einen oberflächlichen und einen tiefen Gefäßplexus, welcher sich zwischen der INL und der OPL befindet [19]. Die Vaskularisierung der tieferen Schicht beginnt in der Rattenretina erst ca. mit P10 und die vollständige Gefäßreifung ist hier erst an P30 abgeschlossen [19]. Im Mechanismus der Vaskularisierung entsprechen sich Mäuse- und Rattennetzhaut.

#### **1.2.1.5. Vascular Remodeling**

Parallel, während und auch nach dem Auswachsen der Gefäße finden Reifungsvorgänge statt (*vascular remodeling*) [6]. Hat der superfizielle Plexus an P5 in Mäusen ca. 2/3 der Retina mit unreifen Gefäßen bedeckt, so beginnt von zentral aus eine Welle der Gefäßreifung [13]. Dabei finden Umstrukturierungen, Abbauvorgänge und auch Verstärkungen an den Gefäßen statt, so kommt es z.B. zu einer Abnahme des Gefäßdurchmessers [6], der kapillären Verschaltungen untereinander (BP = *branching points*) [32] sowie auch zum Abbau von unreifen Gefäßen im kapillären Bereich. All diese Reduktionvorgänge werden vermittelt durch zytotoxische T-Lymphozyten, die an Endothelzellen eine Fas-L- oder CD18-vermittelte Apoptose induzieren [33]. Die Ausbildung der sog. periarteriell gefäßfreien Bereiche (PGB/*capillary free zones*) [34], bei denen es sich um kapillarfreie Regionen in direkter Nachbarschaft zu großen Arterien handelt, kann durch zweierlei Arten zustande kommen [6]: Zum einen durch Abwanderung und/oder Relokalisierung von Endothelzellen [35] oder durch selektive Apoptose von Endothelzellen (siehe oben) [33]. Die treibende Kraft für die Abwanderung bzw. Apoptose der arteriennahen

Endothelzellen ist hier der Sauerstoff, welcher aus den großen Arterien diffundiert. Dies führt zu einer räumlichen Hyperoxie und somit einer verminderten VEGF-Ausschüttung durch die Astrozyten in direkter Nachbarschaft zu großen Arterien, was die Ausbildung von Kapillaren in diesen Bereichen unterbindet. Dieses Phänomen findet sich ebenfalls um den Eintritt des optischen Nervs herum. Dort ist ein zirkulärer, kapillarfreier Ring vorhanden [36]. Außerdem ein wichtiges Merkmal der Gefäßreifung ist die Differenzierung einzelner Gefäße zu Arterien, Venen und Kapillaren [6]. Der zugrunde liegende Mechanismus für diese Differenzierungsvorgänge wird noch untersucht, entscheidend sind hierbei jedoch die genaue Lokalisation des Gefäßes auf der Retina - sowie die dort vorherrschenden Sauerstoff- und VEGF-Pegel [37].

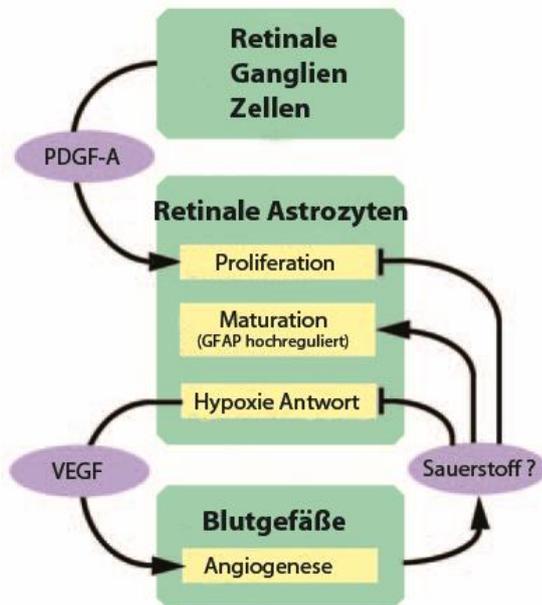
Zur vollständigen Gefäßreifung gehört auch die Umhüllung mit sog. Mantelzellen, Perizyten [6], welche für Erhaltung, Stabilität und Versorgung der Gefäße und Endothelzellen zuständig sind [38]. Sie werden mittels ihres PDGFR $\beta$  durch die PDGFB-Ausschüttung von Endothelzellen rekrutiert [39]. Die PDGFB-Ausschüttung wird dabei wiederum von VEGF gesteuert. Im Rahmen der Gefäßreifung und Ummantelung mit Perizyten verlieren die Gefäße ihre Empfindlichkeit gegenüber VEGF, sodass reife Gefäße auch unabhängig von VEGF existieren können [40].

Seit Jahren bekannt ist außerdem die Beteiligung von Angiotensin1, welches an den Tie2-Rezeptor auf Endothelzellen bindet [41]. Kürzlich konnte außerdem von Simonavicius et al. gezeigt werden, dass Perizyten nicht nur zur Stabilisierung, sondern auch zum Abbau von Gefäßen beitragen. Durch ihren Endosialin-Rezeptor binden die Perizyten an Endosialin-exprimierende, instabile Kapillaren und induzieren so die Destabilisierung des Gefäßes und die Apoptose [42].

Obwohl der genaue Vorgang des *vascular remodeling* noch nicht hinreichend geklärt ist, konnten in verschiedenen Arbeiten schon Gene identifiziert werden, die in diesem vaskulären Reifungsprozess entscheidende Rollen zu spielen scheinen. Dazu gehören z.B. TGF $\beta$  [43], BMP9 und BMP10 [44] oder auch Endoglin [45].

Zeitlebens bleiben das fertig ausgebildete Gefäßnetzwerk, die darunterliegende Astrozytenschablone und die GCL in engem Kontakt miteinander und reagieren äußerst empfindlich auf Veränderungen. Wie in Abbildung 8 gezeigt, regelt das fertig ausgereifte und differenzierte Gefäßnetzwerk über negative Feedback-Mechanismen mit Hilfe von Sauerstoff und VEGF die Proliferation der darunter liegenden

Astrozyten, sodass die Zellpopulationen in Anzahl und Anforderungen stets genau aufeinander abgestimmt sind [18].



**Abbildung 8: Wechselwirkungen in der Netzhaut**

Schematische Darstellung der gegenseitigen Beeinflussung von retinalen Gliazellen, Astrozyten und Blutgefäßen, Erklärung siehe Text; PDGF-A: *platelet derived growth factor A*, VEGF: *vascular endothelial growth factor*; modifiziert nach West 2005

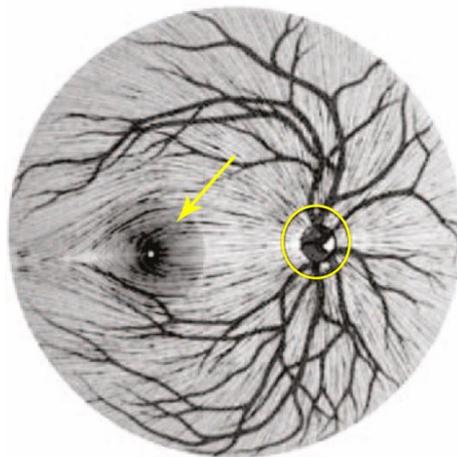
### 1.2.2. Angiogenese in der humanen Retina

Da der Prozess der Gefäßentwicklung in der Netzhaut des Menschen weitestgehend dem der Maus bzw. Ratte entspricht, soll hier nur auf die grundlegenden Unterschiede eingegangen werden.

Aufgrund der beim Menschen vorhandenen, avaskulären Fovea (dem Bereich des schärfsten Sehens, temporal vom optischen Nerv gelegen) verläuft die Entwicklung der innen liegenden Nervenzell- und -faserschichten und somit auch die des Gefäßsystems weniger symmetrisch als in der Nagernetzhaut [46]. Die Axone der Ganglienzellen und auch die Astrozyten wachsen hier in Straßen, die sich auf den nasal liegenden optischen Nerv zu (Axone der Ganglienzellen) bzw. von dort weg (Astrozyten) bewegen. Bei ihrem Wachstum sparen sie die Fovea aus, man spricht von superior-inferiorer Symmetrie [47] (Abbildung 9). Die Gründe hierfür sind noch nicht vollständig erforscht, man geht jedoch von der Expression anti-angiogener Faktoren wie PEDF (*pigment epithelium derived factor*) durch Ganglienzellen im Bereich der Fovea aus [48]. Das Einwandern und Besiedeln der Astrozyten in die

Retina ist dabei in der 25. GW (Gestationswoche = Schwangerschaftsdauer ab dem ersten Tag der letzten Regelblutung) abgeschlossen [46].

Anders als beim Nager ist die Netzhaut des Menschen zum Zeitpunkt der Geburt bereits vollständig vaskularisiert, dabei bleibt physiologischerweise ein schmaler Saum an der *Ora serrata* gefäßfrei [47]. Wie in der Rattenretina, entwickeln sich beim Menschen zwei Gefäßschichten, die oberflächliche Schicht (auf der NFL) startet mit ihrer Entwicklung ca. in der 14./15. GW und hat mit ca. 32 GW die Peripherie der Retina erreicht. Die tiefe Gefäßschicht befindet sich in der INL [30] und startet mit dem Wachstum erst in der 25. GW [46], sodass das retinale Gefäßsystem ca. in der 36. GW fertig entwickelt ist [49].



**Abbildung 9: NFL und Gefäße einer humanen Netzhaut**

Die Axone der Ganglienzellen sind als graue Straßen erkennbar, die Fovea (Pfeil) wird durch das superior – inferiore Wachstum ausgespart; die Gefäße sind in schwarz dargestellt, sie treten aus der Papille (gelber Ring) aus und umwachsen die Fovea symmetrisch; modifiziert nach Gariano 2010

Ob beim Menschen die primäre Vaskularisation der Retina durch Vaskulogenese oder Angiogenese stattfindet, wird bis heute noch diskutiert und es existieren Verfechter für beide Theorien [50] [51] [52] [47] [53].

Die Vorläuferzellen/Astrozyten besiedeln die Netzhaut vom optischen Nerv aus in superior-inferiorer Symmetrie bis hin zur 21. GW. Je nach Hypothese, differenzieren sich die Vorläuferzellen zu Endothelzellen, bzw. wachsen den Astrozyten Endothelzellen, angeordnet in sog. *vascular cords*, nach und sparen dabei nach der Vorgabe der Vorläuferzellen/Astrozyten die Fovea und die temporale Retina aus. Über eine deutliche Beteiligung der Angiogenese an der Vaskularisierung vor allem

der peripheren und tieferen Netzhautschichten ist man sich jedoch einig. In der peripheren Retina konnten an der vaskulären Front des oberflächlichen Plexus, ähnlich der Nagerretina, Endothelzellen mit Filopodien nachgewiesen werden. Die Entwicklung des tiefen Gefäßplexus startet zentral ca. in der 25. GW und dauert bis zum Ende der Schwangerschaft (38. – 40. GW) an. Wie beim Nager kommt es hier zur vertikalen Gefäßsprossung in tiefere Netzhautschichten. Dieser Prozess breitet sich von zentral nach peripher hin aus [46].

Da das retinale Gefäßsystem des Nagers zum Zeitpunkt seiner Geburt und in der ersten Woche *post natum* ein ähnlich unreifes Entwicklungsstadium aufweist wie das retinale Gefäßsystem des Menschen etwa im vierten/fünften Gestationsmonat [54], stellt das Nagetier ein äußerst geeignetes Modellsystem zur Untersuchung physiologischer und vor allem pathologischer retinaler Vaskularisation im (frühgeborenen) Menschen dar. Laut Fleck et al. entspricht dabei der Rattenwelpen zum Zeitpunkt seiner Geburt in seinem Entwicklungsstadium einem Frühgeborenen in der 28. GW, und die ersten 14 Lebenstage des Tieres entsprechen den Gestationswochen 28 – 40 eines menschlichen Frühgeborenen [55].

### **1.3. Medizinische Sauerstoffversorgung menschlicher Frühgeborener und damit verbundene Probleme im Hinblick auf die ROP**

Nach der sporadischen Erstbeschreibung der Frühgeborenenretinopathie (ROP = *retinopathy of prematurity*, damals noch als „retrolentale Fibroplasie“ bekannt) 1942 durch Terry [56], wurde in den 40er und 50er Jahren eine massive Erhöhung der Erblindungsrate bei Frühgeborenen festgestellt.

Babys sind intrauterin in etwa einem  $pO_2$  (Sauerstoffpartialdruck) von 2 – 3 kPa (30mm Hg) ausgesetzt, sodass das Blut des Ungeborenen zu dieser Zeit eine Sauerstoffsättigung von ca. 70% aufweist. Nach der Geburt steigt die Sauerstoffsättigung auf knapp 100% an, da in der Umwelt ein  $pO_2$  von 6 – 10 kPa (60mm Hg) vorhanden ist [57], die Kinder werden also in eine relative Hyperoxie hineingeboren. Diese massive Erhöhung soll physiologischerweise aktivierend auf die postnatale Umstellung von fetalem auf eigenen Kreislauf wirken [58]. Die unreifen Organsysteme Frühgeborener sind für diesen  $O_2$ -Anstieg jedoch noch nicht bereit.

Der in den 40er Jahren üblicherweise exzessive und unkontrollierte Einsatz von 100% Sauerstoff zur Behandlung asphyktischer Früh- und Neugeborener verschlimmerte die geschilderte Situation zusätzlich um ein Vielfaches und ist daher für diese regelrechte Erblindungsepidemie verantwortlich [55]. Erste Tierversuche und die Intensivierung der Forschung in den folgenden Jahren brachten zutage, dass die Hyperoxie durch Vasokonstriktion (VK) und Vasoobliteration (VO) [59] [60] und auch das Verbringen Frühgeborener aus der Hyperoxie zurück in Raumluft über massive Gefäßproliferationen und Netzhautschädigungen hervorruft [61].

All diese neuen Erkenntnisse führten zu einer besser überwachten und strenger geregelten Sauerstofftherapie Frühgeborener. Durch diese restriktive Handhabung stieg jedoch gleichzeitig die Sterblichkeit besonders unreifer Frühgeborener an, die zur Behandlung ihres *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) höhere Sauerstoffkonzentrationen benötigen. Bei ARDS handelt es sich um ein Atemnotsyndrom Frühgeborener, das durch einen Surfactant-Mangel und ungenügende Ausbildung der Lungenalveolen charakterisiert ist [62]. Therapeutisch kann solchen Kindern nur mit Sauerstoffzufuhr oder künstlicher Beatmung über längere Zeit geholfen werden [58]. Zudem überlebten mit der Verbesserung der Intensivmedizin für Frühgeborene in den 70er Jahren immer kleinere, leichtere und somit unreifere Babys, deren therapeutische Behandlung zunehmend eine große Herausforderung darstellt [63]. Grundsätzlich besteht hier also das Problem, dass die sog. „*key guidelines*“ zur Verhinderung einer ROP, nämlich Hyperoxie bei Frühgeborenen zu vermeiden und eine möglichst stabile Sauerstoffzufuhr herzustellen [55], mit den therapeutischen Maßnahmen zur Verhinderung oder Behandlung anderer Erkrankungen Frühgeborener kollidieren.

Lückenloses O<sub>2</sub>-Monitoring Frühgeborener während der Sauerstoffsupplementation wird deshalb heutzutage strengstens empfohlen. Durch Pulsoxymetrie, kontinuierliche, transkutane Sauerstoffpartialdruckmessung und intermittierende Sauerstoffpartialdruckmessung mittels Blutgasanalyse kann die Sauerstoffversorgung des Kindes ständig überwacht und, falls notwendig, nach oben oder unten korrigiert werden [62].

Neben dem wichtigsten Risikofaktor Sauerstoff spielen jedoch auch noch andere wichtige klinische Parameter bei der Entwicklung der ROP eine Rolle. Dazu gehören z.B. CO<sub>2</sub>, Eisen/Hämoglobin und Erythropoietin, aber auch häufige Apnoen und genetische Prädispositionen [64].

## **1.4. Die Frühgeborenenretinopathie**

Betroffen von der Erkrankung sind Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht < 1250 g (ca. 8% dieser Kinder entwickeln eine ROP) bzw. mit einem Gestationsalter < 28 Wochen (ca. 16% dieser Kinder entwickeln eine ROP), sodass in Deutschland jährlich ca. 400 – 600 Risikokinder an einer therapiebedürftigen ROP erkranken [65].

### **1.4.1. Pathogenese**

Bei der Geburt besitzen Frühgeborene ein noch unvollständig ausgebildetes retinales Gefäßsystem. Je nach Zeitpunkt der Geburt sind die retinalen Gefäße mit ihrem Wachstum unterschiedlich weit in die Peripherie vorgedrungen, sodass die periphere, avaskuläre Zone unterschiedlich breit sein kann.

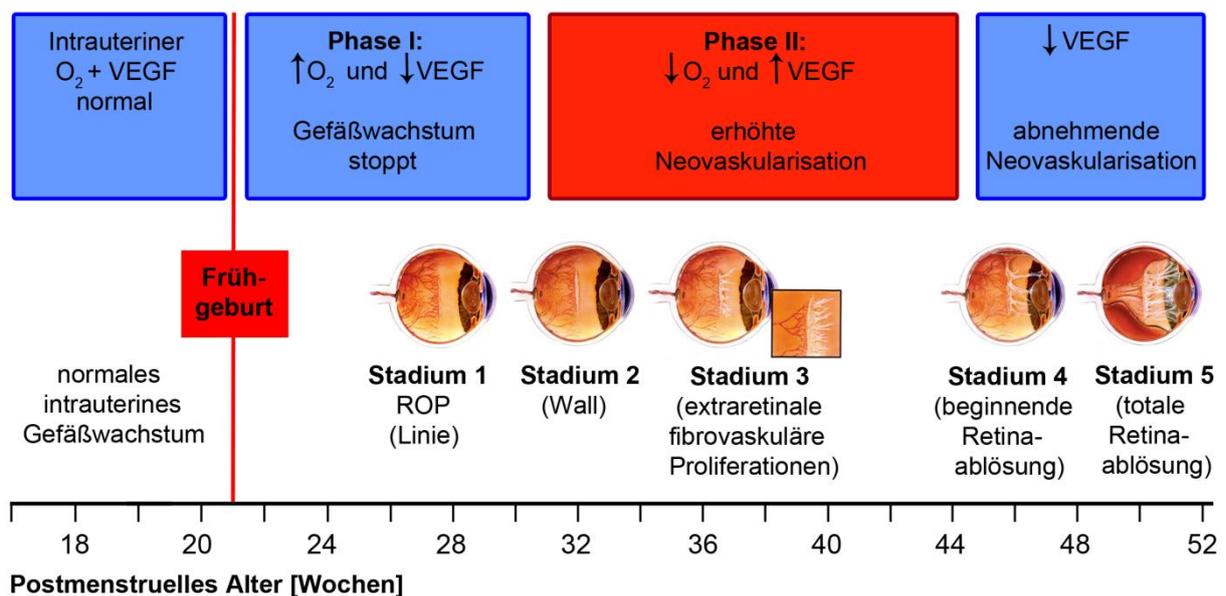
Die Erkrankung weist einen biphasischen Verlauf auf (siehe Abbildung 10). Die erste Phase dauert von der Geburt bis zur ca. 30. – 32. postmenstruellen Woche (Summe aus Gestationsalter und postnatalem Alter) und zeichnet sich durch verlangsamtes oder komplett angehaltenes Gefäßwachstum und sogar Regression bereits vorhandener Gefäße aus. Die zweite Phase beginnt mit 32 – 34 Wochen postmenstruellen Alters und ist durch Vasoproliferation gekennzeichnet [57].

Phase I: Das frühgeborene Kind gerät aus seinem intrauterinen, leicht hypoxischen Umfeld durch die Geburt und das damit verbundene Einatmen von Raumluft in eine relative Hyperoxie. Die unreife Netzhaut ist zu diesem Zeitpunkt noch unvollständig vaskularisiert und deshalb extrem anfällig für Störungen im Sauerstoffhaushalt. Durch die plötzliche Hyperoxie kommt es zu einem Stopp in der Ausschüttung angiogener Wachstumsfaktoren, insbesondere VEGF [55], worauf die vorhandenen Gefäße mit VK und VO reagieren, das Gefäßwachstum wird entsprechend eingestellt [66]. Abhängig von der Entwicklungsstufe der Gefäße, also letztlich dem Geburtsgewicht des Kindes, und der Dauer einer zusätzlicher Sauerstofftherapie variiert entsprechend auch die Schwere der Gefäßregression [55] [67].

Phase II: Durch den Stopp des Gefäßwachstums gerät nun die nicht vaskularisierte Netzhaut in eine lokale Hypoxie. Der Sauerstoffbedarf sämtlicher Zellen der inneren Netzhaut nimmt durch Proliferations- und Differenzierungsvorgänge immer mehr zu, es entsteht eine Ischämie. Als Reaktion darauf wird vor allem von Astrozyten und

Ganglienzellen vermehrt VEGF ausgeschüttet [68], sodass es in der zweiten Krankheitsphase zu einer pathologischen Angiogenese kommt [55]. Die bereits in der Netzhaut vorhandenen großen Gefäße weisen dann eine deutliche Dilatation und Schlingelung (Tortuositas) auf. Gleichzeitig führen VEGF und andere Wachstumsfaktoren zur Proliferation von Endothelzellen und somit zur Formation neovaskulärer Zubildungen, die die ILM durchbrechen und in den Glaskörper hinein wachsen. Bleibt die Therapie in solchen Fällen aus, führt die erhöhte Expression von Wachstumsfaktoren auch zur Rekrutierung von extrazellulären Matrixproteinen wie Fibronektin und Fibrinogen und zur Ablagerung von Fibrin. Die so immer derber werdenden Zubildungen im Glaskörper üben erhöhte Traktionskräfte auf die Netzhaut aus, was zur deren partieller oder totaler Ablösung führen kann [69] [70] [55].

Die an diesen beiden Phasen beteiligten Pathomechanismen werden im Rahmen der Tiermodelle für ROP (1.5.) ausführlich erklärt.



**Abbildung 10: Phasen der ROP**

Schematische Darstellung der Pathogenese von ROP; modifiziert nach Mintz-Hittner 2011 und MediVisuals Inc. 2007

### **1.4.2. Klassifikation der ROP**

Um den Schweregrad der Erkrankung beurteilen zu können, wurde vom Komitee für die Klassifikation von ROP 1984 eine international gültige Klassifikationsgrundlage geschaffen, die 2005 überarbeitet wurde [71]. Demnach unterscheidet man die Lokalisation (Zone), Ausdehnung (Stunden) und die Ausprägung (Stadium) der Erkrankung.

Unter Stadium 1 versteht man die sog. Demarkationslinie. Dabei handelt es sich um eine feine, weiße Linie zwischen vaskularisierter und avaskulärer Netzhaut. Aus der Linie entwickelt sich in Stadium 2 die sog. Leiste, welche nun über die Netzhaut erhaben ist. Im Stadium 3 kommt es zu extraretinalen, fibrovaskulären Proliferationen oder NV, die von der Leiste aus die ILM durchbrechen und in den Glaskörper wachsen. Stadium 4 ist durch die partielle bzw. totale (Stadium 5) Netzhautablösung gekennzeichnet. Als zusätzlich erschwerend zum jeweiligen Krankheitsbefund kann das Vorhandensein der sog. *plus disease*, hinzukommen. Dabei handelt es sich um Venendilatation und Tortuositas der Arterien im posterioren Netzhautbereich [71].

### **1.4.3. Behandlungsmöglichkeiten**

#### **1.4.3.1. Prophylaxe**

Prophylaktisch kann an einer Verhinderung der ROP gearbeitet werden, indem der Einsatz von Sauerstofftherapien auf ein Minimum beschränkt wird. Entscheidend ist dabei vor allem die frühe postnatale Phase. Aufgrund des zu diesem Zeitpunkt noch unvollständig ausgebildeten retinalen Gefäßsystems der Frühgeborenen reagieren diese kurz nach der Geburt besonders empfindlich auf Sauerstoff und müssen bei Einsatz von SO (*supplemental oxygen*) extrem streng überwacht werden (arterielle pO<sub>2</sub>-Messung, transkutane pO<sub>2</sub>-Messung). Sind die Kinder bereits einige Wochen alt, so wirkt sich der Sauerstoff nicht mehr so dramatisch auf deren Entwicklung aus bzw. kann diese sogar begünstigen [22].

Grundsätzlich sollte jedoch die Versorgung mit zusätzlichem Sauerstoff so restriktiv wie möglich gehalten werden. Es ist auf eine möglichst konstante O<sub>2</sub>-Zufuhr zu

achten und die Sauerstoffparameter des Kindes sind stets zu überwachen [58] [64] [22].

#### **1.4.3.2. Frühgeborenen - Screening**

Da sich die ROP klinisch meist nicht direkt nach der Geburt manifestiert, ist eine engmaschige Überwachung von ROP-Risikopatienten in der Zeit nach der Geburt unumgänglich, um nötige therapeutische Schritte rechtzeitig einleiten zu können.

Nach Empfehlung der „Leitlinien der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin“ zur „Augenärztlichen Screening-Untersuchung von Frühgeborenen“ sind Frühgeborene mit einem Gestationsalter von unter 32 Wochen, unabhängig von einer zusätzlichen Sauerstofftherapie, sowie Frühgebore mit einem Gestationsalter zwischen 32 und 36 Wochen, wenn postnatal mehr als drei Tage Sauerstoff verabreicht wurde, in das ROP-Screening miteinzubeziehen. Die Untersuchungsabstände variieren, abhängig von der betroffenen Zone, dem Stadium und dem Vorhandensein einer „plus disease“ [72] [73].

Die chirurgische bzw. medikamentöse Behandlung einer ROP erfolgt im Stadium 3+ in Zone II bzw. in Zone I beim Vorliegen einer „plus disease“, da bei nahezu 90% der restlichen ROP-Patienten eine spontane Regression der akuten Veränderungen zu beobachten ist. Beim Vorliegen einer Therapieindikation entscheidet jedoch die Schnelligkeit über einen Behandlungserfolg [72] [73].

#### **1.4.3.3. Koagulationstherapie**

Bei der klassischen Therapie der ROP handelt es sich um ein chirurgisches Verfahren, die sog. Koagulationstherapie. Technisch stehen dafür zwei Möglichkeiten zur Verfügung, die Kryokoagulation und die Lasertherapie. Die Anwendung der Kryokoagulation ist mittlerweile als veraltet anzusehen, bot jedoch in den 80er Jahren die einzigartige Möglichkeit, die periphere, avaskuläre Netzhaut durch Kälte zu veröden und so die Quelle der VEGF-Ausschüttung auszuschalten [72] [73]. Die heutzutage gängigere Methode ist die Laser- oder Photokoagulation. Hier wird durch

die dilatierte Pupille ein Laser ins Auge eingeführt und die periphere, avaskuläre Netzhaut selektiv verödet. Der Effekt ist wie bei der Kryotherapie die Zerstörung der VEGF-produzierenden Zellen, womit die neovaskuläre Gefäßantwort verhindert wird [74]. Die Vorteile gegenüber der Kryokoagulation bestehen in einer gezielteren Verödung spezieller Bereiche, reduzierter Narbenbildung sowie verbesserter Sehfähigkeit [75] [76].

#### 1.4.3.4. Pharmakologische Therapie

Da VEGF als angiogener Faktor eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der ROP spielt, bieten neue Therapieansätze pharmakologische Verfahren zur Blockierung von VEGF an. Hierfür stehen verschiedene Moleküle zur Verfügung, die entweder sämtliche (Ranibizumab - Lucentis®, Bevacizumab - Avastin®, Aflibercept - Eylea®) oder nur eine spezifische (Pegaptanib sodium → nur VEGF-A165) Isoformen von VEGF inhibieren. Von der US Food and Drug Administration (FDA) für den intraokulären Einsatz am Erwachsenen getestet und als sicher eingestuft sind davon nur Pegaptanib sodium, Ranibizumab und Aflibercept, während Bevacizumab nur *off label* eingesetzt werden kann [76].

Für die Anwendung am Neugeborenen scheinen selektive VEGF-Inhibitoren sinnvoll, da durch sie, so hofft man, nur die pathologische NV, nicht aber die physiologische Vaskularisation blockiert wird. Aufrata et al. konnten 2012 an 34 Patienten zeigen, dass der Einsatz von Pegaptanib (Macugen®) in Kombination mit Lasertherapie bei Stadium 3+ Patienten über einen Beobachtungszeitraum von 19 Monaten keinerlei systemische oder okuläre Nebenwirkungen zeigt. Die stabile Regression der Gefäßveränderungen war signifikant höher als bei Patienten, die nur mit Lasertherapie behandelt worden waren. Außerdem zeigte sich eine schnellere Revaskularisation betroffener Gebiete und es kam seltener zum Wiederauftreten von NV in dieser Gruppe [77].

Auch der Einsatz von VEGF-A komplett inhibierenden Substanzen wird weiter erforscht. Mintz-Hittner et al. veröffentlichten 2011 eine klinische Studie zur intraokularen Injektion von Bevacizumab bei Stadium 3+ Patienten im Vergleich zur konventionellen Lasertherapie (BEAT-ROP = Bevacizumab Eliminates the

Angiogenic Threat of ROP). Im Rahmen der Studie wurden insgesamt 150 Frühgeborene behandelt.

Das Wiederauftreten von ROP im postmenstruellen Alter von 54 Wochen ist demnach abhängig von der Behandlungsart und der Lokalisation (Zone) der Erkrankung. So wurde festgestellt, dass eine Laserkoagulation bei kombinierten Zone I - und Zone II - Erkrankungen bei 26% der Patienten zum Wiederauftreten der Erkrankung führte, während signifikant weniger, nämlich nur 6% der mit Bevacizumab behandelten Kinder, Rezidive entwickelten. Lag dagegen ausschließlich eine Zone I – Erkrankung vor, so entwickelten 42% der mit Laser behandelten Patienten Rezidive, jedoch nur 6% der mit Bevacizumab injizierten Kinder. Bei Erkrankungen der Zone II traten bei 12% der Laserbehandelten und 5% der Bevacizumab-Behandelten Rezidive auf [74] [78].

Die Revaskularisierung der peripheren Netzhaut blieb nach der Lasertherapie logischerweise aus, während sich die Gefäße nach Gabe von Bevacizumab noch weiter in die retinale Peripherie ausbreiteten [74].

Auch an der Augenklinik Gießen wird Bevacizumab seit 2008 *off-label* bei Frühgeborenen mit Stadium 3+ ROP eingesetzt und führte bisher in fünf von sechs behandelten Kindern zu einer nahezu physiologischen Gefäßentwicklung [79].

Trotz der positiven Ergebnisse ist Bevacizumab als Therapeutikum nur mit Vorsicht einzusetzen. Über die Langzeiteffekte dieser VEGF-blockierenden Substanz ist derzeit noch wenig bekannt [79]. Eine Halbwertszeit im Auge von mindestens fünf Tagen [80] könnte über Diffusion oder aktive Ausschleuβung auch unerwünschte Effekte auf andere Organsysteme haben.

## **1.5. Tiermodelle für ROP**

Seit der Erstbeschreibung der ROP 1942 wurden zahlreiche Tiermodelle für diese Krankheit entwickelt und ihre Pathogenese, die Auswirkungen von Sauerstoff auf das unreife Auge sowie Therapiemöglichkeiten intensiv erforscht. Natürlich ist es all diesen Modellen gemein, den Zustand im frühgeborenen Baby möglichst realistisch wiederzuspiegeln zu wollen, was in Abhängigkeit von Versuchstierart und Modellaufbau steht.

## **1.5.1. OIR-Mausmodell nach Smith**

### **1.5.1.1. Entwicklung des Modells**

Da die Krankheit, wie oben schon erwähnt, in den 40er und 50er Jahren noch als sog. retrolentale Fibroplasie bezeichnet wurde, wurden auch die ersten Forschungsarbeiten unter diesem Titel veröffentlicht. Das Verbringen von neugeborenen Mäusen in meist reinen Sauerstoff wurde schon 1955 von Gyllenstein et al. praktiziert. Bei diesen Untersuchungen handelt es sich um die ersten Mausmodelle, welche sich mit den Auswirkungen von Sauerstoff auf das unreife retinale Gefäßsystem beschäftigen [81]. Ende der 1980er Jahre wurde von Gole et al. ein OIR-Mausmodell vorgestellt, bei welchem die neugeborenen Tiere für fünf Tage reinem Sauerstoff ausgesetzt wurden. Nach weiteren fünf Tagen bei Raumluft wurden die Mäuse an ihrem zehnten Lebenstag getötet. Das Ergebnis waren massive Gefäßproliferationen von der Netzhaut aus in den Glaskörper hinein, welche größtenteils mit Perizyten bedeckt waren und keinerlei Anzeichen von *vascular leakage* aufwiesen. Mit Hilfe dieses Modells konnte die vasoproliferative, zweite Phase der ROP gut erforscht werden [82]. Was jedoch den Arbeiten bis zu diesem Zeitpunkt fehlte, war eine reproduzierbare Gefäßreaktion auf die Sauerstoffbehandlung, die Modellierung sowohl der vasoobliterativen, als auch der vasoproliferativen Phase der Krankheit als auch Quantifizierungsmethoden für die Gefäßveränderungen [54].

### **1.5.1.2. Experimentelles Design und Morphologie der Gefäßveränderungen im OIR – Mausmodell nach Smith**

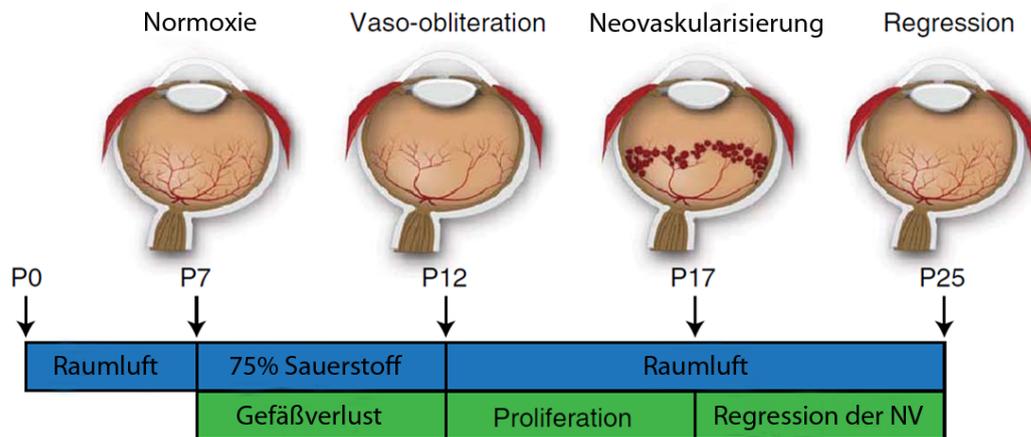
1994 wurde von Lois Smith et al. das bis heute populärste OIR (*oxygen induced retinopathy*)-Mausmodell entwickelt. Mit dem Ziel, ein möglichst realitätsnahes Mausmodell zu schaffen, startet der Tierversuch hier erst am siebten Lebenstag der Tiere (P7 = postnataler Tag 7). Wie oben bereits beschrieben, verfügen die meisten frühgeborenen Babys zum Zeitpunkt ihrer Geburt über ein zwar unvollständiges, jedoch durchaus vorhandenes retinales Gefäßsystem. Aus diesem Grund sind die ersten sieben Lebenstage der Mäuse in Normoxie für die primäre Entwicklung und

Reifung des Gefäßsystems sowie auch für die Regression der hyaloiden Gefäße entscheidend und notwendig. Erst nach dieser initialen Lebensphase werden die Tiere für fünf Tage (P7 – P12) in 75% Sauerstoff verbracht. An P12 werden die Tiere aus der Hyperoxie entnommen und für weitere fünf bis neun Tage (bis P17 bzw. P21) bei Raumluft gehalten (Abbildung 11).

Um den Zeitpunkt der maximalen VO sowie der maximalen NV zu bestimmen, wurden die Retinae der Tiere nun an zahlreichen Versuchstagen untersucht. Belässt man sie länger als acht Stunden in Hyperoxie, so entwickelt sich aus der primären VK eine nicht mehr reversible VO der Gefäße des superfiziellen Plexus im zentralen Bereich der Netzhaut (Abbildung 12 (a)). Das Ausmaß der avaskulären Fläche erreicht sein Maximum ca. an P14, zwei Tage nach dem Zurücksetzen in Raumluft [54]. Zu diesem Zeitpunkt beginnt in der Peripherie (dort bleibt der superfizielle Plexus während der vasoobliterativen Phase intakt) vertikales Sprouting in die tieferen retinalen Schichten zur Ausbildung des tiefen und intermediären Plexus. Die Entwicklung dieser beiden Gefäßschichten findet nun deutlich verzögert und von peripher nach zentral (anstatt physiologischerweise von zentral nach peripher) statt [24]. So weisen die an P17 untersuchten Netzhäute immer noch eine zentral avaskuläre Netzhaut auf, während die retinale Peripherie gut vaskularisiert ist. Die großen Arterien und Venen des oberflächlichen Plexus zeigen Dilatation und Tortuositas und in retinalen Querschnitten wurden subretinale Blutungen gefunden. Am Übergang zur Peripherie findet (beginnend an P15, mit zunehmendem Ausmaß bis P17 und dann wieder abnehmend bis P21) eine starke neovaskuläre Gefäßreaktion mit massiven Proliferationen statt. Diese proliferativen NV weisen eine knäuelartige Struktur auf und werden als sog. neovaskuläre Tufts bezeichnet, sie wachsen in den Glaskörper und enden dort blind (Abbildung 12 (b)) [54]. In späteren Untersuchungen konnte zusätzlich nachgewiesen werden, dass diese Gefäßknäuel komplett von Perizyten ummantelt sind [83]. Die Revaskularisation der zentralen Netzhaut und die vollständigen Regression der NV dauert bis ca. P25 an [54] [24].

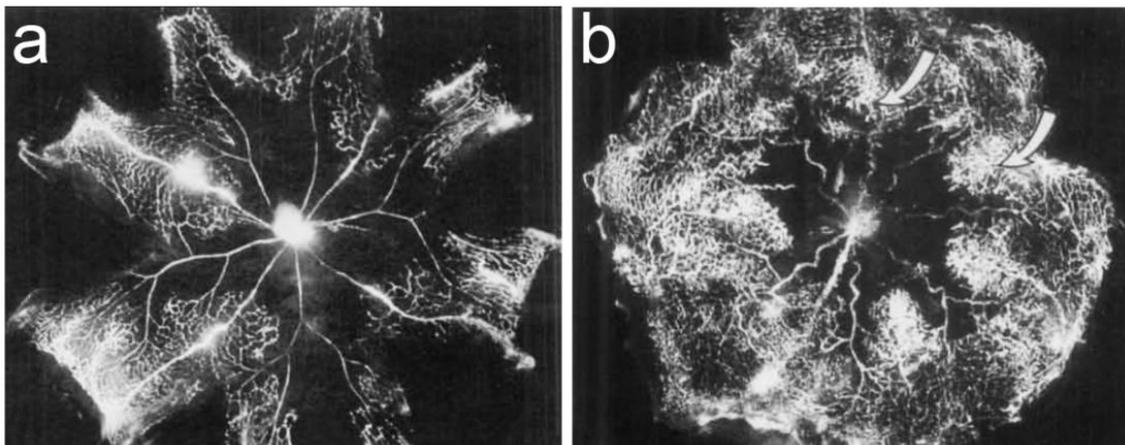
Auch der erhebliche Unterschied in der Ausprägung der OIR-Pathologie zwischen pigmentierten und Albino-Tieren sollte erwähnt werden [26]. So weisen pigmentierte C57BL/6J-Mäuse während der ersten Krankheitsphase eine vasoobliterative Zone auf, die mit der von BALB/cByJ-Mäusen vergleichbar ist. Der Ausprägungsgrad der neovaskulären Zubildungen ist in den pigmentierten Mäusen jedoch um ein

vielfaches größer und auch die Revaskularisation der Netzhaut geht langsamer vonstatten [84].



**Abbildung 11: Experimentelles Setup für das OIR – Mausmodell**

Neontale Mäuse werden zu Versuchsbeginn von P0 bis P7 bei Raumluft gehalten. Die Hyperoxie-Behandlung von P7 bis P12 ruft VK und VO in der zentralen Retina hervor. Nach dem Zurücksetzen in Raumluft an P12 kommt es durch diese relative Hypoxie zu massiven, neovaskulären Zubildungen, die sich bis ca. P25 selbständig wieder zurückbilden; P: postnataler Tag, NV: Neovasuklarisation; modifiziert nach Connor 2009



**Abbildung 12: Fluoreszein-Dextran perfundierte OIR-Netzhäute**

(a) P12 nach 5d Hyperoxie: zentral avaskuläre Retina (b) P17 nach 5d Hyperoxie + 5d Raumluft: massive Gefäßproliferationen (neovaskuläre Tufts, Pfeile); modifiziert nach Smith 1993

### 1.5.1.3. Pathomechanismus der Gefäßveränderungen und beteiligte Faktoren

Der Pathomechanismus des Modells lässt sich in zwei Phasen aufteilen: die primäre, vasooblitative Phase in Hyperoxie von P7 – P12 und die sekundäre, vasoproliferative Phase in Normoxie von P12 bis P17.

Durch die übermäßige Sauerstoffversorgung in der ersten Phase kommt es in der zentralen Netzhaut zur VO, die durch zwei verschiedene Mechanismen ausgelöst wird.

Die toxische Wirkung von Sauerstoff in Überdosis ist einer davon. Wie in 1.2.1. bereits erklärt, kommt es auch unter Normoxie zur Diffusion von Sauerstoff aus den großen Arterien ins umliegende Gewebe, wodurch die sog. PGB entstehen (siehe 1.2.1.). Durch die andauernde Hyperoxie im OIR-Modell diffundiert nun jedoch, von zentral nach peripher abnehmend, deutlich mehr Sauerstoff aus der Papille und den zentralen Abschnitten der großen Arterien [36]. Das Überangebot an Sauerstoff führt zur Entfaltung seiner toxischen Wirkung auf die Endothelzellen der unreifen Kapillaren, was deren Absterben zur Folge hat. Dieser Prozess beginnt zentral am Ort der höchsten Sauerstoffkonzentration und breitet sich nach peripher hin aus. Die toxische Wirkung von Sauerstoff ist lange bekannt und gut erforscht: Während des aeroben Zellstoffwechsels wird Sauerstoff im Mitochondrium zu zwei Wassermolekülen reduziert, als Nebenprodukte entstehen bei dieser Reaktion hochreaktive Sauerstoffradikale (ROS = *reactive oxygen species*), die in großen Mengen zytotoxisch wirken. Unter Hyperoxie kommt es zur vermehrten Produktion dieser ROS. Durch Aufnahme von einem, zwei bzw. drei Elektronen entstehen so das Superoxid-Anion ( $O_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und das äußerst reaktive Hydroxyl-Radikal ( $OH^-$ ). All diese Moleküle entfalten ihre zytotoxische Wirkung auf Zellen durch Lipidperoxidation von Zellmembranen, DANN-Fragmentierung und Proteinoxidation, was letztlich zum Zelltod führt [85] [49]. Dazu kommt die grundsätzliche Empfindlichkeit Frühgeborener gegenüber hyperoxischen Bedingungen, da sie bekanntermaßen aus einem hypoxischen Umfeld *in utero* in eine relative Hyperoxie verbracht werden, was meist nicht problemlos verläuft [49] (siehe auch 1.3.). Die Funktionsfähigkeit antioxidativer Enzyme wie der Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidase und Katalase ist noch nicht vollständig vorhanden und es fehlt den Frühgeborenen die Fähigkeit zur Heraufregulation dieser Enzyme [86].

Bei dem anderen Mechanismus handelt es um die Anpassung der VEGF-A Expression an den hyperoxischen Zustand. Durch Destabilisierung von HIF1 $\alpha$  (siehe 1.2.1.2.) kommt es durch die Hyperoxie zu einer Herabregulation von VEGF-A. Dies führt wiederum zu einer mangelhaften Unterstützung unreifer Kapillaren, welche VEGF als Wachstumsfaktor benötigen. Auf eine kurze Phase der VK der Kapillaren (siehe 1.5.1.2.) folgt dann aufgrund von mangelnder VEGF Versorgung deren Obliteration. Ihre Ummantelung mit Perizyten bewahrt die reifen Arterien und Venen vor dieser Abhängigkeit von VEGF, sodass diese von dem Phänomen vorerst weniger betroffen sind [40] und der Hyperoxie deshalb länger standhalten können [87]. Ohne Zweifel steht dieser Kapillarverlust also in Zusammenhang mit dem Reifegrad der Gefäße. So konnte Smith 1994 schon zeigen, dass ein Verbringen von 24 Tage alten Mäusen (mit maturiertem Gefäßsystem) in 75% Sauerstoff für fünf Tage keinerlei Effekte auf deren Gefäßsystem hat [54].

Die zweite Krankheitsphase des Modells ist gekennzeichnet durch massive, neovaskuläre Proliferationen in den Glaskörper hinein (neovaskuläre Tufts). Die Ursachen für das Entstehen dieser fehlgerichteten, knäuelartigen NV werden bis heute erforscht und sind noch nicht gänzlich bekannt. Fest steht, dass das plötzliche Verbringen der Tiere in die relative Hypoxie (Raumluft) der entscheidende Auslöser für die pathologische NV ist [87]. Am Übergang der vasoobliterativen zur vasoproliferativen Phase an P12 gerät die Netzhaut schnell in einen heftigen, hypoxischen Zustand [87], was zur Aktivierung von HIF1 $\alpha$  und somit zur vermehrten VEGF-A Ausschüttung führt. Diese erreicht an P16 ihr Maximum [88] [89]. Die während der Hyperoxie nicht obliterierten Gefäße werden dadurch zum Sprouting veranlasst, sodass die neovaskulären Veränderungen ihr maximales Ausmaß an P17 erreichen [54]. Die Gründe für die fehlende Orientierung der Gefäße und das damit verbundene Wachstum in den Glaskörper sind dabei weiterhin unklar. Diskutiert wird z. B. die VEGF-Ausschüttung durch vitreale Makrophagen [90], so konnten bei Patienten mit Diabetischer Retinopathie (DR) im Glaskörper erhöhte VEGF-Konzentrationen nachgewiesen werden [89]. Natürlich spielt aber auch die Beteiligung anderer angiogener Faktoren, deren Zusammenspiel untereinander und mit VEGF noch erforscht wird, eine Rolle.

Das Glykoprotein EPO ist, ähnlich wie VEGF, ein von Hypoxie und damit HIF1 $\alpha$  reguliertes Gen, welches neuroprotektive und pro-angiogene Fähigkeiten besitzt [89]. Der EPO-Rezeptor wird nachweislich von Nerven- und Endothelzellen exprimiert und

vermittelt so die beiden genannten Effekte bei Ausschüttung von EPO unter Hypoxie und Hyperoxie [91] [92] [93]. Untersuchungen von Watanabe et al. am OIR-Mausmodell zeigen neben dem oben beschriebenen, erhöhten VEGF-, auch ein erhöhtes EPO-Level an P17 [89]. Die EPO Expression in der frühen, hyperoxischen Krankheitsphase wird dagegen in Abhängigkeit von HIF1 $\alpha$  stark herunterreguliert, sodass die exogene Verabreichung von EPO in dieser Phase durch seine pro-angiogenen Eigenschaften zu einer Milderung der Gefäßpathologie führt [94].

In einer Expressionsstudie von Sato et al. fand weiterhin in der vasoproliferativen Phase des OIR-Mausmodells eine extreme Heraufregulation von TNF $\alpha$  statt [88]. Bei TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ) handelt es sich um ein Zytokin, das hauptsächlich von Makrophagen sezerniert wird. Es ist einer der Hauptmediatoren von Entzündungsreaktionen und kann zahlreiche Veränderungen in der Genexpression von Endothelzellen hervorrufen, unter anderem auch die Vermittlung sowohl pro- als auch anti-angiogener Effekte [28].

Als Marker für den sog. nitro-oxidativen Stress wurde in Satos Studie NOS-2 untersucht, welches maximal an P17 und dann wieder an P21 erhöht exprimiert wird [88]. Bei NOS-2, oder auch iNOS, handelt es sich um die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase 2, ein Enzym, welches im Zusammenhang mit HIF1 $\alpha$  bei Hypoxie hochreguliert wird [95] und über die Bildung hochreaktiver Stickstoffmonoxidmoleküle (NO) aus L-Arginin [96] in hoher Konzentration zytotoxische Wirkung hat [97] [98].

#### **1.5.1.4. Die Rolle der Astrozyten im OIR - Modell**

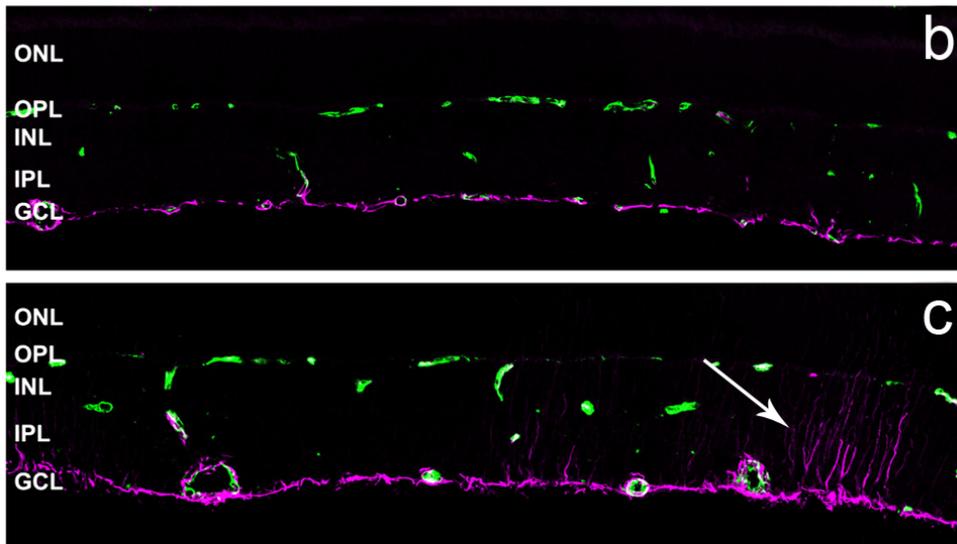
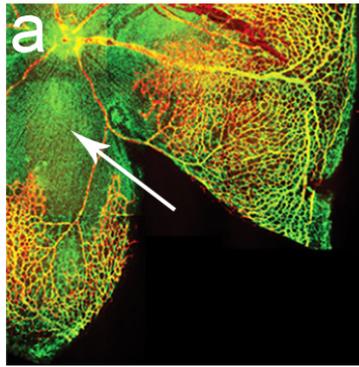
Die tragende Rolle der Astrozyten während der Vaskularisierung der Netzhaut ist hinreichend bekannt (siehe 1.2.1.1.), weshalb auch ihre Beteiligung an den Gefäßveränderungen der ROP bis heute intensiv erforscht wird.

Nachweislich bleibt die Astrozytenpopulation über die Hyperoxie-Phase hinweg stabil, sodass beim Verbringen der Tiere in Raumluft an P12 zwar die zentralen Kapillaren komplett obliteriert, das Astrozytennetzwerk jedoch noch vorhanden ist. Die VO in der frühen Krankheitsphase ist also nicht auf einen Astrozytenverlust, sondern auf eine verminderte Expression von VEGF durch die Astrozyten zurückzuführen [36]. Wie in zahlreichen Tiermodellen gezeigt werden konnte, kommt

es jedoch kurz nach dem Wechsel zur Raumluft zur Degeneration der Astrozyten in den vaso-obliterierten Arealen [68] [84] [83] (Abbildung 13 (a)).

Der massive Zellverlust in Kombination mit der Hypoxie löst in den verbleibenden retinalen Gliazellen (Müller Zellen) eine Stressreaktion aus, die als reaktive Gliose bezeichnet wird (Abbildung 13 (b)). Die reaktive Gliose äußert sich in einer Aktivierung der Müller Zellen, was in diesen Zellen zu einer massiven Heraufregulation der GFAP Expression führt. GFAP wird physiologischerweise nicht von Müller-Zellen, sondern nur von Astrozyten exprimiert. Vor allem in den avaskulären, astrozytenfreien Bereichen der Netzhaut lässt sich in der vasoproliferativen Phase die gesamte Müller-Zelle (von ILM bis OLM, vor allem aber die inneren Endfüßchen) mit anti-GFAP Antikörpern anfärben [16] [99] [84]. Besonders stark sind außerdem die neovaskulären Bereiche, insbesondere die Tufts, mit aktivierten Müller Zellen unterlegt. Eine Reaktion, die sekundär zu den Gefäßveränderungen auftritt [20].

Nach der Degeneration der Astrozyten muss die VEGF Quelle in dieser zweiten Krankheitsphase eine andere sein. Stone et al. konnten 1996 zeigen, dass nach Verlust der Astrozyten die retinalen Ganglienzellen massiv VEGF exprimieren, was die NV erklärt [68]. Laut Fletcher et al. führt der Verlust der Astrozyten und der Shift in der VEGF-Expression in innere retinale Schichten zu dem neovaskulären Gefäßwachstum in den Glaskörper hinein [11]. Im Rahmen dieser Problematik wird bereits an möglichen Therapieansätzen gearbeitet. Der auf Astrozyten zu findende  $AT_1R$ -Rezeptor gehört zum sog. Renin-Angiotensin-System (RAS) und wird durch Angiotensin II aktiviert [83]. Angiotensin II ist ein Wachstumsfaktor für Endothelzellen, der den Effekt von VEGF verstärkt [100]. Downie et al. konnten zeigen, dass der Einsatz eines  $AT_1R$ -Blockers nicht nur das Überleben der Astrozyten sichert, sondern auch eine verbesserte Revaskularisation und deutlich geringere pathologische NV im OIR-Modell vermittelt [83].



**Abbildung 13: GFAP-Expression im OIR-Modell**

**(a)** GFAP-Expression auf einem *flatmount*; P14 Retina mit zentralem Gefäß- und Astrozytenverlust (Pfeil); rot: Isolectin B4, grün: GFAP **(b)** **(c)** GFAP Expression auf Kryoschnitten; **(b)** P18 Kontrolltier mit physiologischer GFAP-Expression in retinalen Astrozyten **(c)** P18 OIR-Tier mit reaktiver Gliose in der Übergangszone (Pfeil); ONL: *outer nuclear layer*, OPL: *outer plexiform layer*, INL: *inner nuclear layer*, IPL: *inner plexiform layer*, GCL: *ganglion cell layer*; grün: Isolectin B4, magenta: GFAP; modifiziert nach Dorrell 2010 und Downie 2007

## **1.5.2. ROP-Rattenmodell nach Penn**

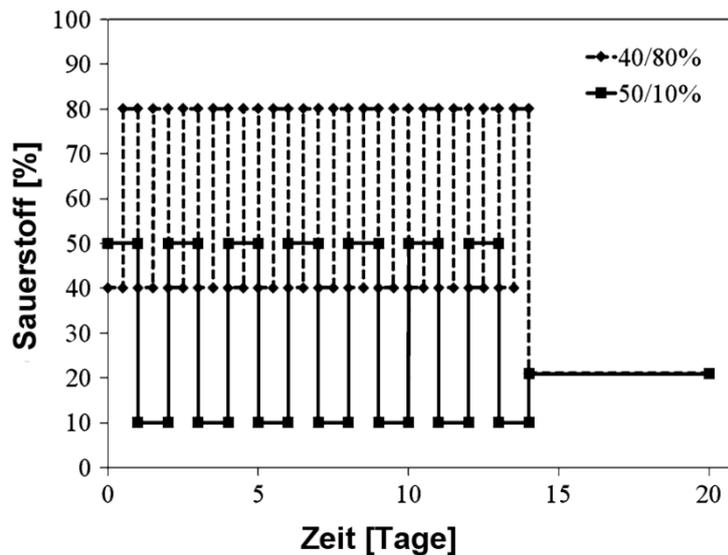
### **1.5.2.1. Entwicklung und experimentelles Design des ROP - Rattenmodells**

Neben dem OIR-Mausmodell wurde auch an verschiedenen Versuchsaufbauten zur Etablierung eines Rattenmodells für die ROP geforscht. So konnte Patz 1954 erstmals neovaskuläre Veränderungen in neonatalen Ratten dokumentieren, die davor drei Tage in Hyperoxie verbracht hatten [101]. Ähnliche Versuche wurden auch in anderen Arbeitsgruppen [59] gemacht, doch allesamt scheiterten an der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, weshalb die Entwicklung eines Rattenmodells für die ROP in den folgenden 20 – 30 Jahren nicht weiter vorangetrieben wurde [102]. Vom Beginn der 90er Jahre an wurde die Arbeit an ROP-Rattenmodellen hauptsächlich von John Penn et al. vorangetrieben. Die Arbeitsgruppe stellte aufgrund der Ergebnisse klinischer Untersuchungen an Frühgeborenen [103] [104] die These auf, dass nicht allein die Hyperoxie, sondern ein Wechsel zwischen Hyperoxie und Hypoxie der entscheidende Auslöser für reproduzierbare Gefäßveränderungen sein könnte [105]. Da Frühgeborene während der Geburt und auch im Rahmen der Nachsorge (siehe 1.3.) ständig wechselnden Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt sind, versprach dieser Versuchsansatz einen starken klinischen Bezug [63].

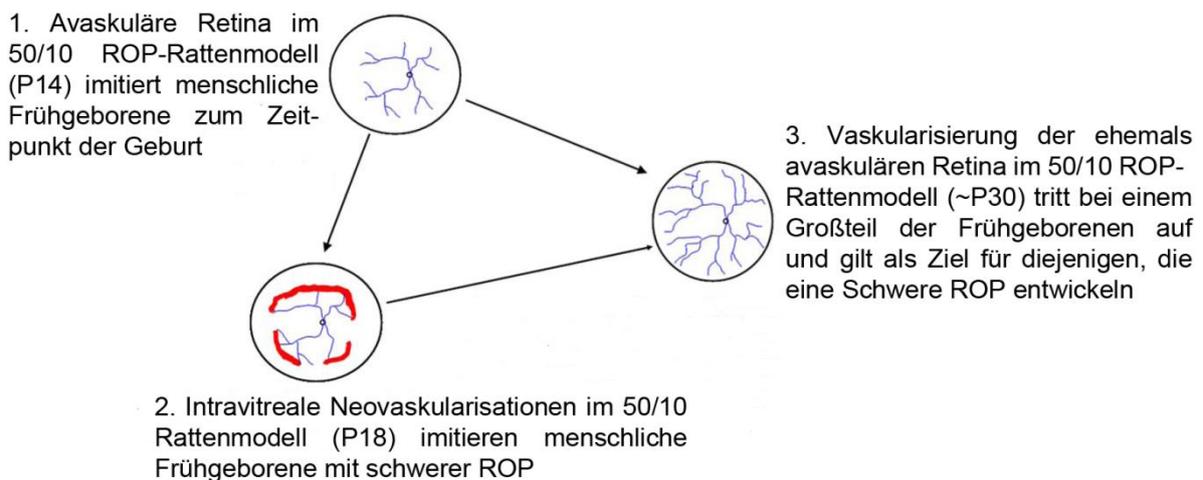
Tatsächlich konnten ausschließlich bei neonatalen Ratten, welche alle 12 Stunden alternierend einer Sauerstofffluktuation zwischen 80% und 40% ausgesetzt worden waren (Abbildung 14), pathologische NV gefunden werden. Tiere, welche permanent in 80% Sauerstoff gehalten wurden, zeigten keine NV. Dies war der Beweis für die Notwendigkeit von fluktuierenden Sauerstoffkonzentrationen für die Etablierung eines ROP-Rattenmodells [105].

Es wurden danach von Penn et al. weitere Versuche durchgeführt, um die Sauerstoffbehandlung mit der größtmöglichen und klinisch relevantesten Schädigungswirkung auf die Gefäße zu ermitteln. So testeten sie z.B. die optimale  $\Delta\text{FiO}_2$  (Differenz zwischen den beiden inspirierten Sauerstoffkonzentrationen [106]), die optimalen Werte für Hyperoxie und Hypoxie [107] und die Dauer der Fluktuation. Nach all diesen Untersuchungen präsentierte sich das 50/10-Rattenmodell (neonatale Rattenwelpen werden von P0 bis P14 im 24-Stunden-Rhythmus in

alternierenden Sauerstoffkonzentrationen von 50% und 10% gehalten und im Anschluss daran von P14 bis P18/P20 in Raumluft verbracht, Abbildung 14) als optimal für die Erforschung von Pathogenese und Therapie der ROP. Die klinische Relevanz des Modells ist in Abbildung 15 dargestellt und macht es bis heute zu den am häufigsten genutzten Tiermodellen für diese Erkrankung [102].



**Abbildung 14: ROP-Modell Sauerstoffregime**  
Schematische Darstellung zweier Sauerstoff-Behandlungsprotokolle für neonatale Ratten; modifiziert nach Barnett et al. 2010

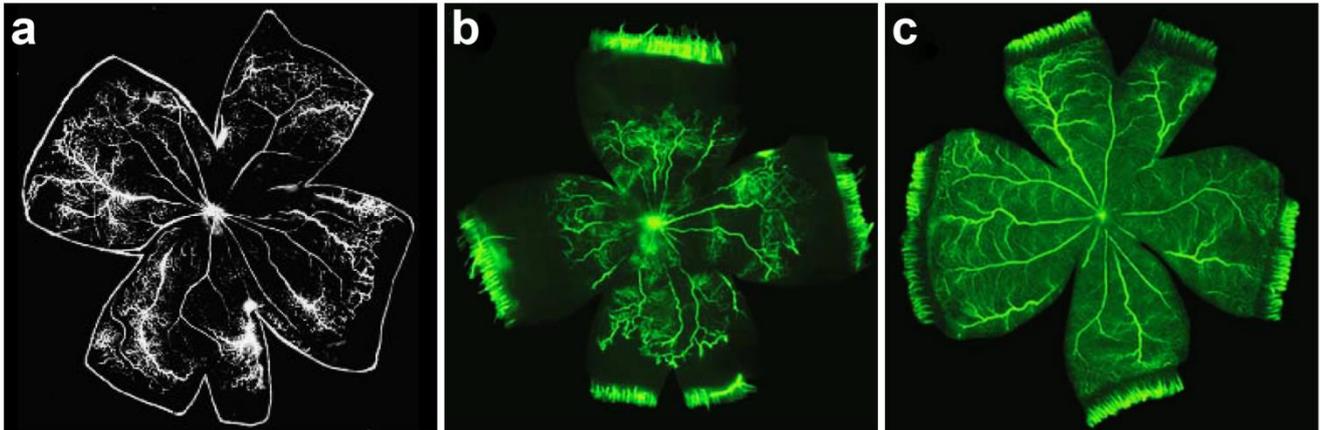


**Abbildung 15: Klinischer Bezug des ROP-Modells**  
Schematische Darstellung und zeitliche Korrelation der retinalen Gefäßpathologien im 50/10 ROP-Rattenmodell und in menschlichen Frühgeborenen; modifiziert nach Hartnett 2010

### 1.5.2.2. Morphologie der Gefäßveränderungen

Wie auch das OIR-Mausmodell lässt sich das ROP-Rattenmodell in zwei Krankheitsphasen einteilen: die vasooblitative Phase erreicht ihr Maximum an P14, die neovaskuläre Phase an P18. In der ersten Phase kommt es durch den Wechsel aus Hyperoxie und Hypoxie zu einer Retardation des Gefäßwachstums, was zu einer peripher avaskulären Retina führt, die ca. 30% der Gesamtfläche einnimmt. Dazu kommt eine massive Zunahme des Gefäßdurchmessers der großen Arterien, Venen und auch der Kapillaren. An P18 finden sich bei fast 98% der Versuchstiere neovaskuläre Veränderungen in der Netzhaut. Die überschießende Gefäßbildung ist dabei im zentraleren Drittel der Netzhaut zu sehen, sprich dem bereits vaskularisierten Bereich. Das Vorhandensein präretinaler neovaskulärer Tufts mit intakten Gefäßwänden beschränkt sich dagegen auf den Übergang von der vaskularisierten zur avaskulären Retina in den Aufzweigungsbereichen der großen Venen (siehe Abbildung 16 (b)). Weiterhin zeigen die großen Arterien Tortuositas und es finden sich zahlreiche Kapillarknospen in den Aufzweigungsbereichen großer Arterien. Blutungen in den Vitreus und teilweises Ablösen der Retina konnten bei einem Teil der Tiere ebenfalls beobachtet werden [107].

Weiterhin konnte Penn bei seinen Versuchen feststellen, dass die P14 Retina einer 40/80-Ratte (siehe Abbildung 16 (a)) eine ähnliche Gefäßverteilung aufweist wie die OIR-Mäusenetzhaut an P12. Der sichtbare zentrale Gefäßverlust ist dabei laut Autor auf die deutlich höhere Sauerstoffzufuhr zurückzuführen [107], deren Mechanismus bereits in 1.5.1.3. erklärt wurde. Die moderate Hyperoxie im 50/10-Modell führt dagegen zu einer Verlangsamung der Plexusausbreitung in der Peripherie, bei der die periphere, avaskuläre Fläche ca. 3x größer ist als die im 40/80-Modell. Auch die 10%ige Hypoxie im 50/10-Modell übt offensichtlich einen sehr viel stärker hemmenden Effekt auf die Vasoformation aus als die 40%ige, relative Hypoxie im 40/80-Modell [107].



**Abbildung 16: FITC-dextran perfundierte Netzhäute des ROP-Rattenmodells**

**(a)** P14 Netzhaut des 40/80-Modells mit zentral avaskulärer Retina und beginnenden Neovaskularisationen im Übergangsbereich **(b)** P20 Netzhaut des 50/10 Modells **(c)** P20 Kontrollnetzhaut; modifiziert nach Penn et al. 1994

### 1.5.2.3. Pathomechanismus der Gefäßveränderungen

Der Pathomechanismus der VO und NV wurde bereits beim OIR-Mausmodell erklärt und kann genauso für das Ratten-, Hunde- oder Katzenmodell gelten. Trotz unterschiedlicher Länge, Frequenz, Intensität und Zeitpunkt der Insulte ist allen Modellen der initiale Verlust von Kapillaren gefolgt von massiver NV gemein [108]. Deshalb soll nur auf die Besonderheiten des Rattenmodells eingegangen werden.

Auch im Rattenmodell spielt VEGF sowohl in Bezug auf VO als auch auf NV eine zentrale Rolle. Im Unterschied zu einer Herabregulation von VEGF an P14 im OIR-Mausmodell, führt die konsequente Fluktuation von Sauerstoff im 50/10-Modell zu einer Heraufregulation von VEGF-A164, welches die wichtigste Isoform in Bezug auf neovaskuläre Veränderungen ist [109]. Diese erhöhte Expression von VEGF an P14 ist verwunderlich, da aufgrund der massiven VO eher eine Herabregulation wie im OIR-Mausmodell zu erwarten wäre. Die Ergebnisse konnten jedoch von mehreren Gruppen erzielt werden und lassen deshalb keinen Zweifel zu [63] [109] [110]. Die zweite, vasoproliferative Phase erreicht ihr Maximum an P18, was sich in einer deutlichen Heraufregulation von VEGF-A164 und VEGFR2 und dementsprechender Neovaskularisation äußert [109].

Wie auch im Mausmodell, macht im Rattenmodell die Erforschung der Tufts nur langsame Fortschritte und ist noch längst nicht abgeschlossen. Hier werden ebenfalls Untersuchungen zur VEGF-Konzentration im Glaskörper bzw. Blockierung von VEGFR2 durchgeführt [109], sowie die Wirkung des neurotrophen Angiogenese-

Inhibitors PEDF [111] untersucht, welcher bei Hyperoxie hochreguliert wird [109] [112] und nachweislich die Bindung zwischen VEGF und VEGFR2 beeinflusst [113].

### **1.5.3. ROP - Katzen- /Hundemodell**

#### **1.5.3.1. Das ROP – Katzenmodell**

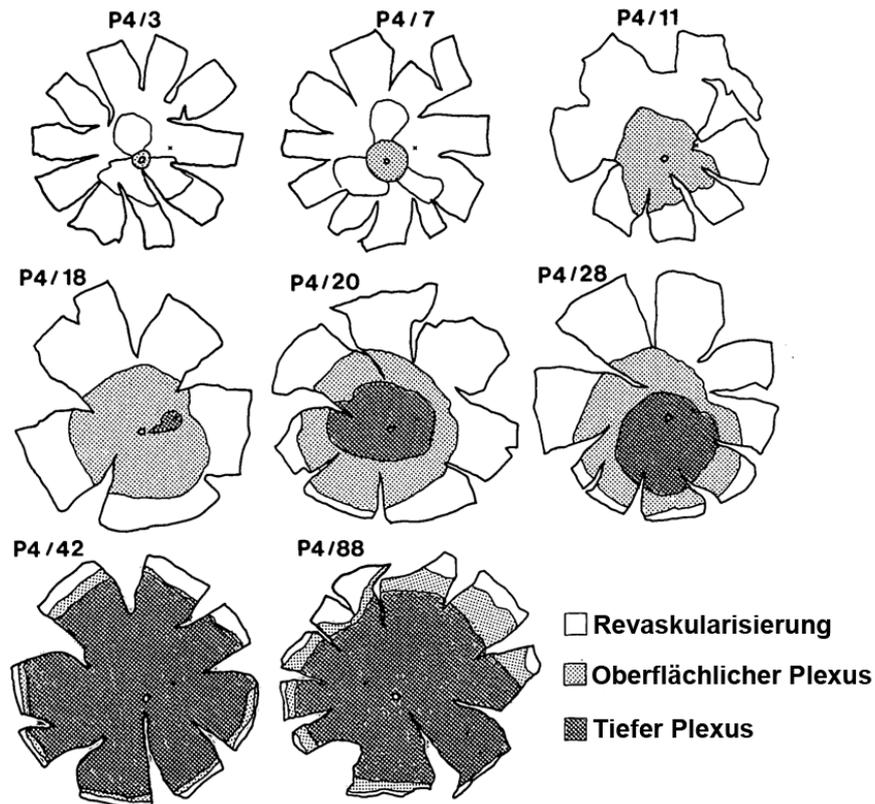
Die Entwicklung des retinalen Gefäßsystems der Katze beginnt, anders als beim Nagetier, bereits intrauterin und dauert bis mindestens P20 an. Der äußerste Rand der Katzennetzhaut bleibt dabei zeitlebens avaskulär. Da die Katzenretina zum Zeitpunkt der Geburt bereits zu 30 – 40% vaskularisiert ist, konnte sich diese Tierart als ROP-Modelltier letztlich nicht durchsetzen [114].

Neben den ersten Nagermodellen für ROP, die in den 50er Jahren entstanden, versuchten Asthon et al. auch ein Katzenmodell für diese Krankheit zu etablieren. Nach dem Verbringen junger Katzen in Hyperoxie und Rückkehr zur Raumluft kann, wie auch in den Nagermodellen, eine vasooblitative und eine vasoproliferative Phase unterschieden werden [59]. Kremer et al. griffen die Idee 1987 wieder auf und verbrachten drei bis zehn Tage alte Katzen für 65 bis 72 Stunden in 80% Sauerstoff. *In vivo* Untersuchungen mittels Funduskopie fanden während dieser Zeit regelmäßig statt. Die Tiere wurden dann 18 bis 21 Tage nach Zurücksetzen in Raumluft getötet und die Netzhäute analysiert.

An Tag drei nach Verbringen in Hyperoxie weisen alle Tiere eine VO der retinalen Gefäße auf, was eine retinale Ischämie hervorruft [115]. Bei genauerer Untersuchung der VO fanden Chan-Ling et al. nach vier Tagen Hyperoxie nur noch wenige durchgängige Gefäße im zentralen Bereich der Netzhaut. Im etwas größeren Umkreis vom optischen Nerv sind zudem einzeln stehende Gefäßinseln nachweisbar, die teilweise noch Blutzellen enthalten und die demnach durch VO entstanden sein müssen. Nach sechs Tagen Hyperoxie sind keinerlei retinale Gefäße mehr vorhanden [116].

Ab ca. acht Tagen nach Zurücksetzen in Raumluft sind durch die relative Hypoxie pathologische NV zu beobachten, wobei zwei verschiedene Arten von NV eine Rolle spielen. Zum einen findet eine Revaskularisation der gefäßlosen Retina statt, die

intraretinal vom Eintritt des optischen Nervs nach außen strebend verläuft [115]. Dieser Prozess kann durch Wiederöffnen von obliterierten Gefäßen geschehen, oder die neuen Gefäße umwachsen den optischen Nerv in einer Art Rosette. Wiedereröffnete und neu gewachsene Gefäße verschmelzen im Lauf der Zeit (ca. ab P11 in Raumlufte), wobei die Area centralis vorerst ausgespart wird und erst an P18 in Raumlufte wieder revaskularisiert vorliegt. Die Revaskularisation geht deutlich verlangsamt vonstatten, sodass der oberflächliche Plexus an P18 in Raumlufte gerade den posterioren Teil der Netzhaut bedeckt [116] (Abbildung 17). Die neu gebildeten Gefäße weisen außerdem Dilatation [115] und *vascular leakage* [116] auf. Der Übergang von der revaskularisierten zur avaskulären Netzhaut befindet sich im posterioren Teil des Auges und ist gekennzeichnet durch sog. *brush-like*, bürstenähnlich und erweitert auslaufende, retinale Gefäße. Sie kommen durch massives kapilläres Wachstum in den Endbereichen der großen Gefäße zustande. Bei der zweiten Art von NV handelt es sich um die bereits beschriebenen neovaskulären Tufts, die die ILM durchbrechen und in den Glaskörper hinein wachsen. Die Tufts sind im kompletten, revaskularisierten Bereich zu finden, jedoch vermehrt in der Umgebung des optischen Nervs, den sie zirkumferenziell umwachsen. Nach Kremer et al. sind sie oft mit Blutungen in den Glaskörper kolokalisiert [115], später konnte dann tatsächlich die Fenestrierung dieser Tufts nachgewiesen werden [116]. Wie in Abbildung 17 gezeigt, dauern die sich selbst regulierenden Wiederherstellungsvorgänge der Gefäße in Raumlufte bis ca. P88 an [116].



**Abbildung 17: ROP-Katzenmodell**

Schematische Darstellung der Gefäßentwicklung neugeborener Katzen nach vier Tagen Hyperoxie und unterschiedlich langer Zeit in Raumluft (P4/...); modifiziert nach Chan-Ling 1992

### 1.5.3.2. Das ROP – Hundemodell

Der Etablierungsversuch eines Hundemodells für die ROP fand im Vergleich zum Katzenmodell erst sehr viel später statt. So führten McLoud et al. 1996 erste Voruntersuchungen zur VK und VO in neonatalen Hundeaugen durch. Das retinale Gefäßsystem des Hundes ist zum Zeitpunkt der Geburt etwas weiter entwickelt als das der Katze, wobei jedoch die postnatale Entwicklung bzw. Gefäßreifung im Hund langsamer vonstatten geht [117]. Aus diesem Grund wurden für das endgültige ROP-Hundemodell Welpen bereits am ersten Lebenstag (P1) für vier Tage in 95 - 100% Hyperoxie verbracht und direkt an P5 zur Untersuchung der VO getötet. Nach vier Tagen (P5) Hyperoxie kommt es zu einer Abnahme der Vaskularisation im Vergleich zur Kontrollgruppe um 60%, was sich in einer Reduktion der kapillären Gefäßdurchmesser und in einer Abnahme der kapillären Dichte bemerkbar macht.

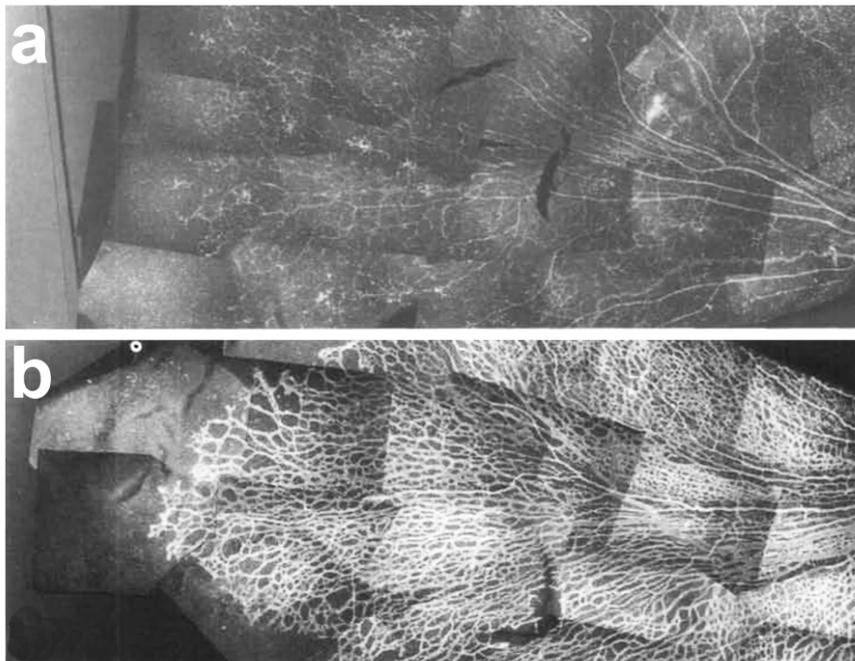
Diese vasokonstriktorische/vasoobliterative Reaktion auf die Hyperoxie erstreckt sich in uniformem Verteilungsmuster über die gesamte Netzhaut, ohne bestimmte Bereiche stärker oder schwächer zu betreffen (Abbildung 18) [118].

Nach vier Tagen Hyperoxie werden die Tiere in Raumluft verbracht, zu definierten Zeitpunkten getötet und die Vasoproliferation untersucht. An P8 (drei Tage in Raumluft) zeigt sich, neben einem insgesamt irregulären, orientierungslosen Gefäßwachstum, eine deutliche Dilatation und Tortuositas der großen Gefäße und eine Erhöhung des kapillären Durchmessers mit mangelhafter Ausbildung der PGB. Da zu diesem Zeitpunkt die Hundenetzhaut noch nicht vollständig vaskularisiert ist, finden sich an der Grenze vom durchbluteten zum avaskulären Bereich (anteriorer Teil des Auges) kapilläre Neubildungen und eine massiv erhöhte Anzahl an Zellen in Mitose. An P15 findet man, ähnlich der Katze, sog. *brush-like-borders* in den Endbereichen der großen Gefäße, die durch massives kapilläres Wachstum entstehen und der Vaskularisierungsgrenze ein bürstenähnliches Bild verleihen. Diese kapilläre Proliferation findet nicht nur intraretinal, sondern auch präretinal (die ILM in Richtung Glaskörper durchbrechend) statt, was zu einer Verdoppelung der Schichtdicke der inneren Netzhaut in diesem Bereich führt. An P22 zeigen sich weiterhin Tortuositas und Dilatation, sowie überschießendes Kapillarwachstum in der Übergangszone (*brush-like-borders*) [119]. Das massive Kapillarwachstum führt zu einer weiteren Verdickung der inneren Netzhaut, sodass sich ein regelrechter Wall, *ridge*, im Übergangsbereich bildet, der stark an die Demarkationslinie der humanen ROP erinnert [120].

Später konnten die NV mithilfe von neuen Methoden dann genauer charakterisiert und lokalisiert werden. Im gesamten posterioren Teil der Netzhaut wurden besonders dichte, anastomosierende Gefäßstrukturen gefunden, die die zentrale Retina wie ein Teppich bedecken. Daneben finden sich auch präretinale, membranöse, tuft-artige Strukturen, die in den Glaskörper hinein wachsen und bei 20% der Tiere zu traktionalen Faltungen der Netzhaut führen. Die intravitrealen Gefäße und Tufts bilden innerhalb des Glaskörpers durch Verschmelzung ein dichtes Netzwerk, welches bei älteren Tieren teilweise durch Kollagenfasern ersetzt wird [120].

Die Rückbildung der genannten neovaskulären Veränderungen nimmt viel Zeit in Anspruch und dauert bis mindestens 40 Tage nach Zurücksetzen in Raumluft an [120].

Zusammengefasst stellt das Hundemodell durch seine realitätsnahen Gefäßpathologien und vor allem aufgrund deren langer Persistenz zwar eine gute Möglichkeit zur Erforschung der ROP dar, konnte sich jedoch aufgrund von ethischen Bedenken, aus Kostengründen und dank ebenfalls guter Ergebnisse in Nagermodellen nicht gegen diese durchsetzen.



**Abbildung 18: ADPase gefärbte Hundenetzhäute, P5**  
(a) Vasoobliteration im Hundeauge nach vier Tagen Hyperoxie (b) Kontrolltier;  
modifiziert nach McLeod 1996

## 1.6. Die periventriculäre Leukomalazie

Bei der periventriculären Leukomalazie (PVL) handelt es sich um eine Form der *white matter disease*, einer Schädigung der weißen Hirnsubstanz von Frühgeborenen. Sie gehört zu den häufigsten Ursachen für motorische Schäden dieser Kinder [121], während die Schädigung der grauen Substanz eher Einschränkungen der kognitiven Fähigkeiten hervorruft [122] [123] [124]. Da das menschliche Gehirn zum Zeitpunkt der Geburt das schnellste Wachstum aufweist, ist die Empfindlichkeit gegenüber äußeren Einflüssen in diesem Zeitraum maximal und begünstigt die Entstehung von Erkrankungen wie der PVL [125].

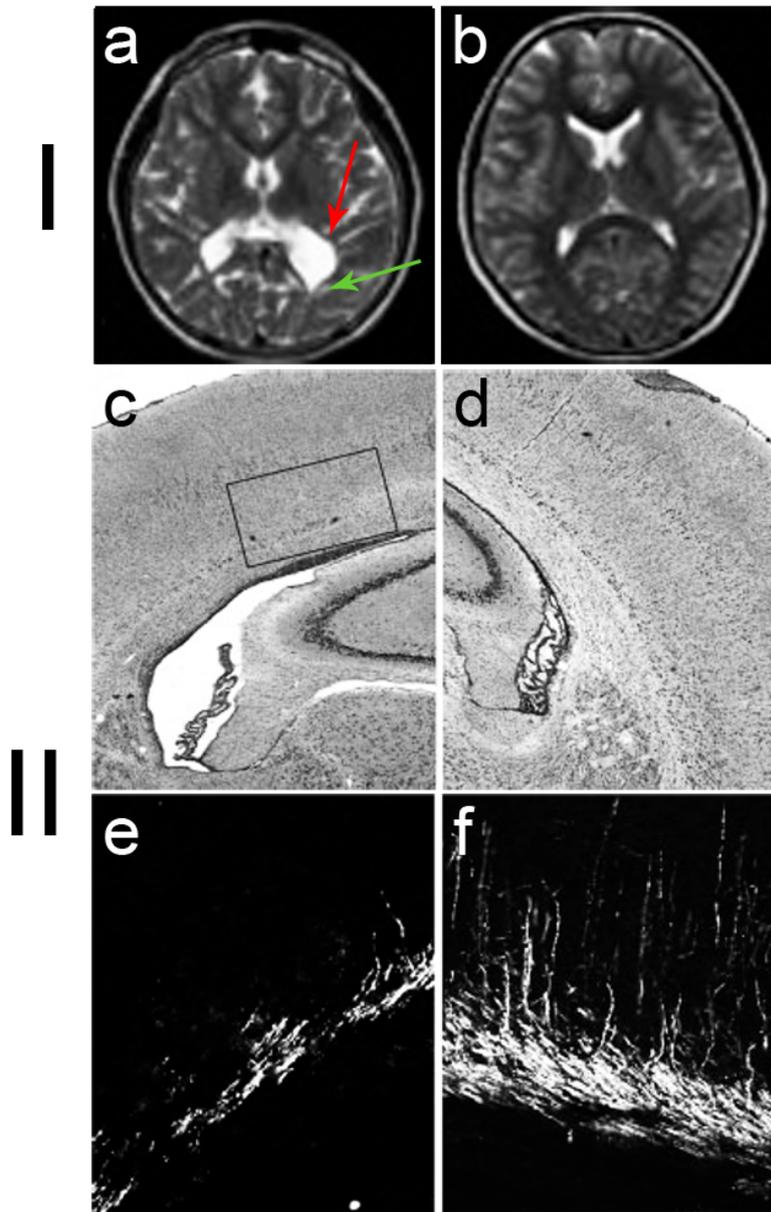
Ursächlich für die PVL ist die ungenügende Myelinisierung von Nervenfasern im Gehirn von Frühgeborenen. Die Erkrankung ist multifaktoriell begründet und kann z.B. durch neonatale Infektionen, Inflammationen und Ischämien, v.a. aber durch Sauerstoff-abhängige Schädigung unreifer Oligodendrozyten und auch durch Kombinationen verschiedener Mechanismen hervorgerufen werden. Die bei Frühgeborenen noch nicht vorhandene Fähigkeit zur Autoregulation der zerebralen Gefäße spielt ebenfalls eine Rolle, da sie eine besonders hohe Vulnerabilität gegenüber Sauerstoff bewirkt [126].

Nachdem die sauerstoff-abhängige Schädigung der unreifen Lunge und der unreifen Netzhaut schon länger bekannt waren, wurden in den 90er Jahren auch zahlreiche Tierversuche zur Beteiligung von Hypoxie/Ischämie an der PVL durchgeführt [127] [128] [129], mittlerweile konnte auch eine Beteiligung von Hyperoxie an der Schädigung und Apoptose neuronaler Zellen im unreifen Gehirn von Frühgeborenen nachgewiesen werden [130] [124]. Der Schädigungsmechanismus und die toxische Wirkung von Sauerstoff unter Hyperoxie wurden schon in 1.5.1.3. erklärt und führen über die Bildung hochreaktiver Sauerstoffradikale zur Fragmentierung von DNA, Lipiden und/oder Proteinen.

Unreife Oligodendrozyten stellen sich hierbei, ähnlich wie die Endothelzellen der unreifen Retina, als besonders empfindlich gegenüber den Sauerstoffradikalen heraus. Vor ihrer Reifung sitzen diese Zellen noch periventrikulär (in den Randbereichen der Lateralventrikel) und bilden später in der Entwicklung die Myelinschichten für die neuronalen Axone [131]. Im Rahmen der postnatalen Sauerstoffschwankungen und der damit verbundenen hypoxischen bzw. hyperoxischen Zustände im Gehirn kann es zum massenhaften Absterben von unreifen Oligodendrozyten kommen, was dann zur ungenügenden Myelinisierung von Nervenfasern im Gehirn der Frühgeborenen und somit zu späteren motorischen Schäden führt [132] [133].

Die Diagnose der Erkrankung gestaltet sich schwierig und ist heutzutage nur mittels hochauflösendem Ultraschall oder noch besser mittels MRT (Magnetresonanztomographie) zu stellen. Eine Vergrößerung der Lateralventrikel in Folge der Verschmälerung der periventrikulären weißen Substanz (siehe Abbildung 19 (a)) ist dabei genauso kennzeichnend wie veränderte Signalintensitäten und Diffusionseigenschaften der periventrikulären, weißen Substanz. Kleine Blutungen oder lokale, kleinstrukturelle Läsionen werden ebenfalls häufig gefunden [134] [135].

Als Folge der fehlenden Nervenscheiden entwickeln die betroffenen Kinder im frühen Kleinkindalter zahlreiche neurologische Defizite, die sowohl mentale und motorische Funktionen (Zerebralparese), als auch Hör- und Sehstörungen umfassen [58] [136]. Als typische Erkrankung Frühgeborener tritt die PVL häufig in Kombination mit der ROP auf [137]. Die bedarfsgerechte Behandlung dieser Erkrankungen stellt nach wie vor ein großes Problem dar. Beachtet man die unterschiedlichen Anforderungen der unreifen Organe (vor allem Lunge, Gehirn und Auge) an die postnatale Sauerstoffversorgung, so erscheint eine umfassende Lösung nicht möglich. Gerade die für die Lunge so wichtige Beatmung mit hochprozentigem Sauerstoff ruft im Auge und Gehirn die bereits erklärten, schwerwiegenden Schäden hervor [138] [139]. Eine Therapie für die Erkrankung gibt es derzeit nicht, die Forschung beschäftigt sich jedoch intensiv mit verschiedenen Stoffen, die die Empfindlichkeit der Oligodendrozyten gegenüber Sauerstoff-Radikalen senken sollen und so zur Prävention der PVL beitragen [138] [139]. Auch die frühzeitige Behandlung mit neuroprotektiven Substanzen wie EPO ist vielversprechend und wird bereits intensiv erforscht [140] [141].



**Abbildung 19: Periventrikuläre Leukomalazie**

**I (a), (b)** Humane PVL (T2-MRT Aufnahmen) **(a)** Kind mit massiver PVL, zu erkennen an der Vergrößerung der in weiß dargestellten Laterallateralventrikel (roter Pfeil) und der Verschrämerung der in schwarz dargestellten weißen Substanz (grüner Pfeil) **(b)** gesundes Kind; **II (c) - (f)** PVL in einer P10 Ratte nach unilateraler Karotisligatur (UCL) an P6 **(c),(d)** Hämatoxylin-Eosin Färbung **(c)** Verschrämerung der periventrikulären weißen Substanz und Vergrößerung des Laterallateralventrikels auf der zur UCL ipsilateralen Seite **(d)** Normale Ventrikelgröße auf der zur UCL kontralateralen Seite **(e), (f)** Myelin-Basis-Protein (MBP) Färbung als Marker für die weiße Substanz, vergrößerte Darstellung des in **(c)** eingezeichneten Kastens **(e)** hochgradiger Verlust der MBP-Expression in der zur UCL ipsilateralen Hirnhälfte **(f)** mäßiger Verlust der MBP-Expression in der zur UCL kontralateralen Hirnhälfte; modifiziert nach Nagasunder et al. 2011 [142] und Gerstner et al. 2009

## 1.7. Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit werden erstmals retinale Veränderungen im Hinblick auf eine ROP im PVL-Rattenmodell analysiert, da diese beiden schwerwiegenden Erkrankungen in der Klinik recht häufig in Kombination auftreten. Wie schon mehrfach erwähnt, kann dafür der übermäßige Einsatz von Sauerstoff in der peri- und postnatalen Periode Frühgeborener verantwortlich sein, aber auch andere Risikofaktoren kommen hier in Frage [64]. Bis dato existieren zwar zahlreiche Tiermodelle für jede Erkrankung einzeln, jedoch wurden noch nie sauerstoffbedingte Veränderungen beider Organsysteme im selben Tiermodell untersucht.

Neonatale Long Evans Ratten erhalten an P6 eine unilaterale Karotisligatur sowie verschiedene Sauerstoffbehandlungen. Damit werden vier Versuchsgruppen geschaffen (Hypoxie/Ischämie, Hyperoxie, Hypoxie/Ischämie + Hyperoxie und Normoxie), deren Netzhäute und Gehirne an P7, P11 und P21 molekularbiologisch untersucht werden sollen. Es werden hierbei Genexpressionprofile für HIF1 $\alpha$ , VEGF-A164, EpoR, TNF $\alpha$  NOS-2 erstellt. Zusätzlich finden an P11 *in vivo* Untersuchungen (Fluoreszenz-Angiographie (FA) und MRT) statt und es werden an P11 und P21 die Netzhäute und Gehirne immunhistochemisch analysiert. Bezüglich der Augen werden dabei Endothelzell-Immunfluoreszenzfärbungen retinaler *flatmounts* angefertigt und anhand dieser Präparate die Ausbreitung des tiefen Gefäßplexus, die Durchmesser großer Gefäße, die Ausdehnung der PGB sowie die Anzahl an BP bestimmt. Mit Hilfe dieser Methoden sollen Aussagen über Gefäßpathologien und Maturationszustand der retinalen Gefäße getroffen werden.

Durch Anwendung von sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Verfahren zur Untersuchung von Gehirn und Augen und einem Beobachtungszeitraum von 21 Tagen ist es weiterhin möglich, Krankheitsverläufe bei den einzelnen Tieren verfolgen zu können und die Präzision und Aussagekraft bildgebender Verfahren zu beurteilen.

Synchronisierte Untersuchungszeitpunkte für Augen und Gehirn ermöglichen daneben eine Korrelation der gefundenen Veränderungen. Da das Auge als vorgelagerter Teil des Gehirns für Untersuchungen sehr viel leichter zugänglich ist, sollen anhand der Gefäßpathologien in der Netzhaut Rückschlüsse auf die Veränderungen im Gehirn gezogen werden und so eine frühzeitige Diagnose und aufeinander abgestimmte Behandlungsmethoden für beide Erkrankungen ermöglicht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 20 dargestellt. Eine Versuchsrunde umfasste 20 neonatale Ratten, wobei die Tiere in vier Gruppen eingeteilt werden: Hypoxie/Ischämie (A), Hyperoxie (B), Hypoxie/Ischämie + Hyperoxie (C) und Normoxie (D, Kontrollgruppe). Die Tiere der Gruppen A und C erhielten am sechsten Lebenstag (P6) eine unilaterale Ligatur (UCL) der linken Arteria carotis communis (ACC) und wurden dann für eine Stunde in eine Box mit 6% Sauerstoff verbracht. Tiere der Gruppen B und D erhielten keine Karotisligatur. Nach Ablauf der Stunde kehrten die Tiere der Gruppen A und D zusammen zurück zur Mutter. Die zehn Tiere der Gruppen B und C wurden zusammen mit einer Rattenmutter für 24 Stunden in eine Hyperoxiebox gesetzt, in welcher eine 80%ige Sauerstoffatmosphäre herrschte. Am Lebenstag P7 wurden die Tiere der Gruppen B und C zusammen mit ihrer Mutter zurück in einen herkömmlichen Käfig verbracht. Direkt im Anschluss wurde je ein Tier aus jeder Gruppe (A, B, C, D) für molekularbiologische Untersuchungen getötet. Am Lebenstag P11 erfolgten *in vivo* Untersuchungen eines Tieres jeder Gruppe in Form von Fluoreszenz-Angiographie (FA) und Magnetresonanztomographie (MRT), dieses Tier wurde an P21 erneut *in vivo* untersucht. Ein Tier jeder Gruppe wurde danach für molekularbiologische Untersuchungen getötet sowie ein weiteres Tier jeder Gruppe für immunhistochemische Untersuchungen. Die bereits an P11 mittels FA und MRT untersuchten Tiere wurden an P21 erneut angiographisch befundet, im MRT gescannt und danach für immunhistochemische Untersuchungen getötet. Das letzte Tier pro Gruppe wurde für molekularbiologische Untersuchungen genutzt. Es wurden insgesamt vier solcher Versuchsrunden durchgeführt. Als Abkürzung für die verschiedenen Gruppen und Augen (Seitenunterscheidung aufgrund der UCL in den Gruppen A und C) ergibt sich damit folgendes Schema:

<b>Abkürzung</b>	<b>Gruppe</b>	<b>Intervention</b>
A-L	Hypoxie/Ischämie – linkes Auge	UCL (links) ipsilateral + 1h in 6%iger Hypoxie
A-R	Hypoxie/Ischämie – rechtes Auge	UCL (links) kontralateral + 1h in 6%iger Hypoxie
B	Hyperoxie	Nur Hautschnitt + 24h in 80%iger Hyperoxie
C-L	Hypoxie/Ischämie + Hyperoxie – linkes Auge	UCL (links) ipsilateral + 1h in 6%iger Hypoxie + 24h in 80%iger Hyperoxie
C-R	Hypoxie/Ischämie + Hyperoxie – linkes Auge	UCL (links) kontralateral + 1h in 6%iger Hypoxie + 24h in 80%iger Hyperoxie
D	Normoxie	Nur Hautschnitt - Kontrollgruppe

**Tabelle 1: Abkürzungen für Interventionsgruppen**

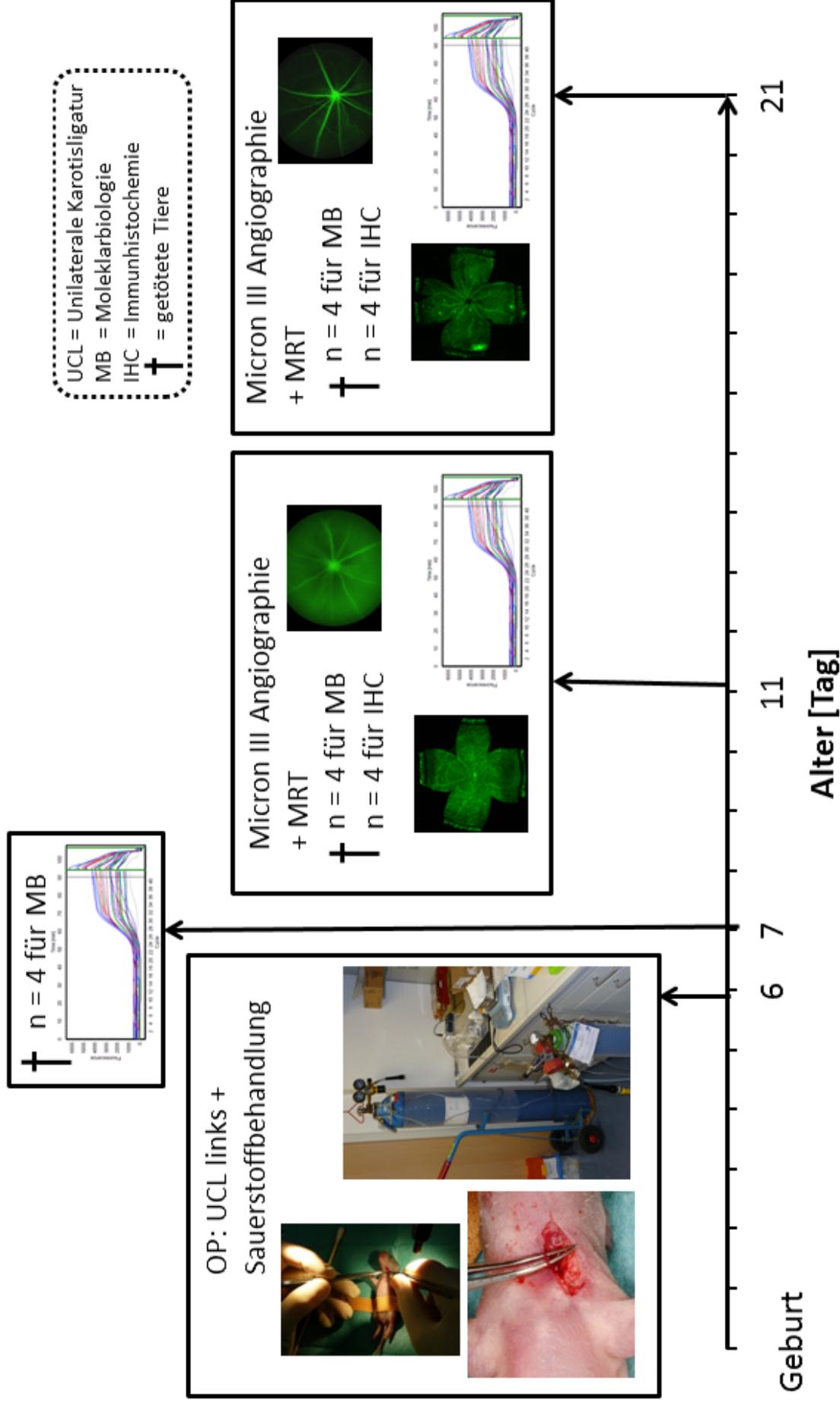


Abbildung 20: Zeitlicher Ablauf eines Tierversuchs

## 2.2. Materialien

### 2.2.1. Arzneimittel

Produkt	Wirkstoff	Hersteller
0,5% Pursept		eigene Herstellung
Antisedan® 5mg/ml	Atipamezol	Janssen, Neuss
Domitor® 1mg/ml	Medetomidin	Janssen, Neuss
Dormicum® V 5mg/5ml	Midazolam	Roche, Grenzach-Vühlen
Drawing Inks Tusche		Hardtmuth, České Budějovice
Ethanol 70%		eigene Herstellung
Fentanyl® 0,1 mg	Fentanyl	Ratiopharm, Ulm
Floureszin Alcon®		Floureszin Alcon®
Flumazenil Inresa® 0,5mg/ 5ml	Flumazenil	Inresa Arzneimittel, Freiburg
Isofluran Forene®	Isofluran	Abbott, Wiesbaden
Methocel ®2% Lösung		Novartis, Nürnberg
Mircozid Sensitive Wipes		Schülke, Norderstedt
Mydriaticum Stulln UD®	Tropicamid	Pharma Stulln, Stulln
Naloxon Inresa® 0,4 mg	Naloxon	Inresa Arzneimittel, Freiburg
Natriumchlorid 0,9%®		Braun, Melsungen
Novalminsulfon ®1g/2ml	Metamizol	Ratiopharm, Ulm
Octanisept®		Schülke, Norderstedt
Proparacain POS 0,5% Augentropfen®	Procain	Ursapharm, Saarbrücken

Tabelle 2: Narkotika, Medikamente, Injektionslösungen, Desinfektion

### 2.2.2. Substanzen

Produkt	Hersteller
BSA, Albumin bovine fraction V	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Donkey Serum	Sigma, München
Fluorescent Mounting Medium	Dako, Hamburg
LC Green Plus+	Idaho Technologies, Boise Idaho, USA
Leica Gefriereinbettmedium	Leica, Wetzlar
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Sucrose	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Triton-X-100 reinst	Roth, Karlsruhe

Tabelle 3: Substanzen für Immunfluoreszenz

Zur Erzeugung einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung (PFA) zur Gewebefixierung wurden 4g Paraformaldehyd in einer kleinen Flasche abgewogen und mit 0,1M PB auf 100 ml aufgefüllt. Die Flasche wurde dann in ein Wasserbad gestellt (1l Becherglas auf einer Heizplatte) und bei ca. 55°C gerührt, bis die Lösung klar war. Danach wurde die Flüssigkeit aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

	<b>Rezept Blocklösung</b>	<b>Rezept Inkubationslösung</b>	<b>Mengen für 20ml - Ansatz</b>
<b>Normal Donkey Serum (NDS)</b>	10 %	3%	2 ml für Block-, 0,6 ml für Inkubationslösung
<b>Bovines Serumalbumin (BSA)</b>	1%	1%	jeweils 0,2 g
<b>TritonX-100</b>	1%	1%	jeweils 4 ml einer 5%igen Stocklösung
<b>Natriumazid</b>	0,02%	0,02%	jeweils 80 µl einer 5%igen Stocklösung
<b>0,1M PB</b>	ad n ml	ad n ml	13,72 ml für Block-, 15,12 ml für Inkubationslösung

**Tabelle 4: Block- und Inkubationslösung für *flatmount*-Färbungen**

	<b>Rezept Blocklösung</b>	<b>Rezept Inkubationslösung</b>	<b>Mengen für 2ml - Ansatz</b>
<b>Normal Donkey Serum (NDS)</b>	10 %	3%	0,2 ml für Block-, 0,06 ml für Inkubationslösung
<b>Bovines Serumalbumin (BSA)</b>	1%	1%	jeweils 0,02 g
<b>TritonX-100</b>	0,5%	0,5%	jeweils 0,2ml einer 5%igen Stocklösung
<b>0,1M PB</b>	ad n ml	ad n ml	1,58 ml für Block-, 1,72 ml für Inkubationslösung

**Tabelle 5: Block- und Inkubationslösung für Gefrierschnitt-Färbungen**

Für die 5%ige TritonX-100 Stocklösung wurden 5ml TritonX-100 in 95ml ddH<sub>2</sub>O gelöst und bei 4°C aufbewahrt.

Die Herstellung der 10%, 20% und 30%igen Sucroselösungen erfolgte folgendermaßen: Auf einer Waage wurden 1g bzw. 2g bzw. 3g Sucrose in einem 15 ml Falcon Tube abgewogen und mit 0,1M PB auf 10g aufgefüllt. Nachdem die

Lösungen gut geschüttelt wurden und wieder klar waren, wurden die Flüssigkeiten auf entsprechend beschriftete 2 ml Eppendorfgefäße verteilt.

Zur besseren Gewebekonservierung wurde der 30%igen Sucrose noch 0,02% Natriumazid hinzugefügt, was bei einer Gesamtmenge der Sucroselösung von 10ml 40µl einer 5%igen Stocklösung Natriumazid entspricht.

Die Herstellung der 5% Natriumazid-Stocklösung muss aufgrund der Giftigkeit des Stoffes unter dem Abzug und unter Verwendung von Schutzbrille, Schutzkleidung und Nitrilhandschuhen erfolgen. Für 20 ml einer 5% Stocklösung wurde 1g Natriumazid reinst in 20 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst, in 1,5 ml Eppendorfgefäße aliquotiert und mit entsprechendem Warnhinweis bei -20° eingefroren.

Produkt	Hersteller
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
GenAgarose LE	Genaxxon, Ulm
LC Green Plus+	Idaho Technologies, Boise Idaho, USA
RNA Later Solution	Ambion, Life Technologies, Darmstadt
RNase free DNase	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

**Tabelle 6: Substanzen für RNA-Extraktion, Reverse Transkription und PCR**

### 2.2.3. Puffer

Produkt	Hersteller
0,1M Posphate buffer (PB)	eigene Herstellung
1x Phosphate- buffered saline (PBS)	eigene Herstellung
1x Tris-buffered saline (TBS)	eigene Herstellung
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline	Life Technologies, Darmstadt

**Tabelle 7: Puffer**

Zur Herstellung der 0,2M PB Stammlösung wurden 43,42g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O und 5,24g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O abgewogen und mit dH<sub>2</sub>O auf 1l aufgefüllt. Der pH-Wert wurde dann auf 7,4 eingestellt und der Puffer steril filtriert. Um eine 0,1M Gebrauchslösung zu erhalten, wurde der 0,2M Puffer 1:1 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt.

Zur Herstellung der 10x PBS Stammlösung wurden 2g KCl, 2g H<sub>2</sub>KPO<sub>4</sub>, 11,5g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O und 80g NaCl abgewogen und mit dH<sub>2</sub>O auf 1l aufgefüllt. Der pH-Wert wurde dann auf 7,4 eingestellt und der Puffer steril filtriert. Zum Gebrauch

wurde der 10x Puffer mit dH<sub>2</sub>O 1:10 verdünnt, um eine 1x PBS-Gebrauchslösung zu erhalten.

Zur Herstellung von 10x TBE wurde 242,2 g 1M Tris, 102,7 g 0,82M Borsäure und 7,44 g 10mM EDTA abgewogen und mit dH<sub>2</sub>O auf 2l aufgefüllt. Zum Gebrauch wurde der 10x Puffer mit dH<sub>2</sub>O 1:10 verdünnt, um eine 1x TBE-Gebrauchslösung zu erhalten.

Produkt	Hersteller
0,82M Borsäure	Merck, Darmstadt
10mM EDTA	Roth, Karlsruhe
1M Tris	Roth, Karlsruhe
C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	Roth, Karlsruhe
H <sub>2</sub> KPO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
KCl	Roth, Karlsruhe
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt

**Tabelle 8: Chemikalien zur Pufferherstellung**

## 2.2.4. Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Automatic Star Deckgläser 24x50 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen
Barrier Facemask	Mölnlycke Healthcare, Göteborg
BD Microlance 3 Kanülen Nr. 1 (20G), gelb	Becton Dickson, Madrid
BD Plastipak 1ml	Becton Dickson, Madrid
Chirurgische Einmalskalpelle Cutfix	Braun, Melsungen
Cryomold Biopsy 4565 Tissue Tek® Einbettformen	Sakura Finetek, Staufen
Dako Pen für Gefrierschnitte	Dako, Hamburg
Deluxe High Temperature Cautery Kit	Fine Science Tools, Heidelberg
Diet Gel Boost Gelwasser	Clear H2O, Maine
Einmalspritzen 2 ml, 5 ml, 10 ml	Braun, Melsungen
Einweg-Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
ES Kompressen 5x5 cm	Hartmann, Heidenheim
Foliodrape 45x75 cm	Hartmann, Heidenheim
Gasflasche 6% Sauerstoff	Linde, Pullach
Gasflasche 80% Sauerstoff	Linde, Pullach
Hudson RCI	Teleflex, Athlone
Kalt-/ Warm-Kompressen	Söhngen, Taunusstein
Leukoplast 1 cm	BSN Medical, Hamburg
Lumocolor® permanent compact 342	Staedtler, Nürnberg
Mikrotom-Klingen	Leica, Wetzlar

Minispike Filter	Braun, Melsungen
MoliNea Plus D 60x90cm	Hartmann, Heidenheim
Mutifly Kanülenset	Sarstedt, Nümbrecht
Neolus 20 G Kanülen	Terumo, Leuven
Nitril Untersuchungshandschuhe S, M, L	Nobaglove, Wetter
Omnifix Luer Lock 10 ml Einmalspritzen	Braun, Melsungen
Superfrost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
Vasco OP Protect Handschuhe	Braun, Melsungen
Vaseline Album	Facron, Barsbüttel
Vlies-Kittel	Medical Care & Serve Industry, Willich
Wattestäbchen Assistent	Karl Hecht AG, Sondheim
PCR TW Tube 0.2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Reagiergefäß 2.0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Prolene 5-0 Ethicon	Ethicon, Livingston
100 Sterican Kanülen 30G x 1/2", gelb	Braun, Melsungen
Reagiergefäß 1.5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Precellys Ceramic Kit 1,4 mm	Peqlab, Erlangen

**Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien**

### 2.2.5. Antikörper

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Alexa Fluor® 594 Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	Life Technologies, Darmstadt
Alexa Fluor® 647 Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	Life Technologies, Darmstadt
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)	Life Technologies, Darmstadt
Isolectin GS-IB4 From Griffonia simplicifolia, Alexa Fluor® 488 Conjugate	Life Technologies, Darmstadt
Mouse anti-Ng2 antibody, monoklonaler Antikörper	Abcam, Cambridge, UK
Rabbit anti-glia fibrillary acidic protein (GFAP) Polyklonaler Antikörper	Merck Millipore, Darmstadt

**Tabelle 10: Antikörper und Lektine**

## 2.2.6. Enzyme und Marker

Produkt	Hersteller
Alignment Marker QX RNA 15 nt	Qiagen, Hilden
Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Prime Star HS DNA Polymerase	Takara, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
PrimeScript cDNA Synthesis Kit	Takara, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
RNA Size Marker 200 – 6000 nt	Qiagen, Hilden
RNase free DNase	Qiagen, Hilden

**Tabelle 11: Enzyme und Marker**

## 2.2.7. Primer

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion bezogen und mit ddH<sub>2</sub>O zu einer Gebrauchskonzentration von 10 pmol/μl verdünnt.

Gen	Fragmentgröße	Primersequenz
EpoR ( <i>erythropoietin-receptor</i> )	115 Basenpaare	Sense CGGCTCCATGCGTTTCTGGTGT Antisense ATGCGGTGGTAGCGAGGAGATC
HIF1α ( <i>hypoxia inducible factor 1, alpha subunit</i> )	180 Basenpaare	Sense GCACCGATTGCGCCATGGAGG Antisense TCACGTTGTGGGGAAGTGCC
HPRT ( <i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i> )	105 Basenpaare	Sense TTGTTGGATATGCCCTTGACT Antisense CCGCTGTCTTTTAGGCTTTG
NOS-2 ( <i>inducible nitric oxide synthase 2</i> )	225 Basenpaare	Sense CTGGAGGTGCTGGAAGAGTT  Antisense CTTCGGGCTTCAGGTTATTG
TNFα ( <i>tumor-necrosis-factor alpha/TNF superfamily, member 2</i> )	111 Basenpaare	Sense AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC Antisense TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC
VEGFα ( <i>vascular endothelial growth factor A/ 164</i> )	180 Basenpaare	Sense ATGAACTTTCTGCTCTCTTGGGTGC Antisense ATTGGACGGCAATAGCTGCGCT

**Tabelle 12: Primersequenzen**

Die Primersequenzen für TNF $\alpha$  und Nos2 wurden aus Chidlow et al., 2009 übernommen [143], alle übrigen Primer wurden mit Hilfe des Programms Vector NTI selbst designt.

### 2.2.8. Geräte

Gerät	Hersteller
Aesculap Schere	Aesculap, Tuttlingen
Arium® 611 DI	Sartorius, Göttingen
Arium® 6131	Sartorius, Göttingen
Autoklav DX-65	Systec, Wettenberg
Binokular SMZ 168	Motic, Wetzlar
BioDocAnalyze Biometra, Göttingen	BioDocAnalyze Biometra, Göttingen
BioPhotometer Eppendorf	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Biozero II Analyzer Software	Keyence, Neu-Isenburg
Biozero II Viewer Software	Keyence, Neu-Isenburg
Brand Transferpette® S	Brand, Wertheim
Cycler quantitative PCR - Realplex 4	Eppendorf, Wesseling/Berzdorf
Dumont #5 Forceps	Fine Science Tools, Heidelberg
Dumont #55 Forceps	Fine Science Tools, Heidelberg
Eismaschine Scotsman, Berlin	Eismaschine Scotsman, Berlin
Elektrophorese Powersupply Biometra, Göttingen	Elektrophorese Powersupply Biometra, Göttingen
Fine Iris Scissors	Fine Science Tools, Heidelberg
Fluoreszenz-Mikroskop Biozero	Keyence, Neu-Isenburg
Funduskop (Micron III)	Phoenix Research Laboratories, U.S.A.
Gelkammer Whatman	Biometra, Göttingen
Gewebehomogenisator Precellys 24	Peqlab, Erlangen
Hardened Fine Iris Scissors	Fine Science Tools, Heidelberg
Heizmatte Terratemp	JBL GmbH & Co.KG, Neuhofen
Hypoxiebox	eigene Herstellung
Isocage	Tecniplast, Casale Litta
Isofluran Verdampfer	Dräger, Lübeck
Kryostat Leica CM3050	Leica Microsystems, Wetzlar
Laborwaage Adventurer Pro	Ohaus, Pinebrook
Laborwecker	Dostmann, Wertheim
Lichtquelle Schott KL 1500 LCD	Schott, Mainz
Luftsauerstoffgerät Gox	Greisinger Electronic, Regenstauf
Magnetrührer	IKA, Staufen
Mono Channel Rodent Thermometer	Bioseb, Pinellas Park
Moticam 1 Binokularkamera	Motic, Wetzlar
Nadelhalter Halsey with Tungston Carbide Jaws	Fine Science Tools, Heidelberg
Nadelhalter Halsey with Tungston Carbide Jaws	Fine Science Tools, Heidelberg
PCR-Cycler T Professional Basic Gradient Biometra, Göttingen	PCR-Cycler T Professional Basic Gradient Biometra, Göttingen
pH-Meter Seven Easy	Mettler Toledo, Gießen

Pinzette Bonn 45°	Fine Science Tools, Heidelberg
Pinzette Bonn 7cm	Fine Science Tools, Heidelberg
Qiaxel Gel-Elektrophorese	Qiagen, Hilden
Qiaxel RNA Quality Control Cartridge	Qiagen, Hilden
Qiaxel Screen Gel Software	Qiagen, Hilden
Rotlichtlampe IR808	Efbe, Bad Blannkenburg
Schott KL 500 electronic Lichtquelle	Schott, Mainz
Wipptisch WT17	Biometra, Göttingen
software <i>syngo</i> ® MR B15	Siemens, München
Streampix Software	Norpix, Montreal
Thermoblock Biometra, Göttingen	Thermoblock Biometra, Göttingen
Vannas Spring Scissors - 3mm Blades	Fine Science Tools, Heidelberg
Waage Ohaus, Zürich	Waage Ohaus, Zürich
Zeiss Stemi 2000	Zeiss, Oberkochen
Zentrifuge 1-15 PK	Sigma, München
Zentrifuge AK15	Sigma, München
Zilien- und Fadenpinzette	Geude, Heidelberg

**Tabelle 13: Geräte**

## 2.3. Methoden

Die für die *in vivo* sowie *in vitro* benötigten Materialien sind in den Tabellen 2 bis 13 aufgeführt.

### 2.3.1. In vivo Versuche

#### 2.3.1.1. Tiere

Für die jeweiligen Versuche wurden von der Firma Janvier terminiert verpaarte Long Evans Ratten geliefert. Die Tiere wurden über den Versuchszeitraum im Tierhaus des BMFZ (Biomedizinisches Forschungszentrum) der Phillips-Universität Marburg im 12 Stunden Tag-Nacht-Lichtzyklus mit *ad libitum* Futter und Wasser gehalten. Sämtliche Tierversuche wurden nach den Richtlinien der ARVO (*Association For Research In Vision And Ophthalmology*) durchgeführt. Die Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Gießen unter den Aktenzeichen Az.: V54-19c2015(1)MR20/14 Nr. 31/2011 und V54-19c2015(1)MR20/14 Nr. 93-2012 genehmigt.

### **2.3.1.2. Pharmakologische Interventionen**

#### **2.3.1.2.1. Narkose/Anästhesie**

Zum Narkotisieren der Tiere wurde eine sog. vollständig antagonisierbare Anästhesie (VAA) verwendet, der Vorteil der VAA liegt in ihrer guten Steuerbarkeit und ihrer umfassenden hypnotischen, analgetischen und muskelrelaxierenden Wirkung.

Empfohlen wird eine Dreifachkombination aus Fentanyl (Opiatagonist mit relativ kurzer aber sehr starker analgetischer Wirkung), Midazolam (Benzodiazepin mit anxiolytischer, relaxierender und krampfhemmender Wirkung) und Medetomidin (spezifischer  $\alpha_2$ -Adrenozeptoragonist mit sedativ-hypnotischer und analgetischer Wirkung). Bei dieser Narkoseform ist jedoch aufgrund der teilweise starken atemdepressiven Wirkung von Fentanyl und der bradykarden Nebenwirkung von Medetomidin der Allgemeinzustand (bei neonatalen Ratten vor allem Hautfarbe) und die Atemtätigkeit der Tiere stets kritisch zu überwachen, im Falle eines Atemstillstands ist sofort die entsprechende Antagonistenmischung zu injizieren.

Die Applikation sämtlicher Substanzen erfolgte über eine intraperitonäale (i.p.) Injektion mit 30G Kanülen (siehe Abbildung 21).

Sämtliche Dosierungen für Ratten wurden aus Erhardt bzw. Henke et al. [144] ([http://www.mueller-heinsberg.de/Narkose\\_Nager\\_PDF.pdf](http://www.mueller-heinsberg.de/Narkose_Nager_PDF.pdf)) übernommen, bzw. gegebenenfalls durch uns an die Bedürfnisse neonataler Ratten angepasst, da für neonatale Tiere in der Literatur keine Angaben zu finden sind. So konnte unsere Arbeitsgruppe am Lebenstag sechs der Tiere eindeutig eine höhere Narkosetoleranz der Ratten feststellen, sodass hier nicht 0,1ml VAA/10g (siehe unten), sondern 0,15ml/10g verwendet werden mussten, um die Tiere für die OP ausreichend zu sedieren.



**Abbildung 21: Intraperitonäale Injektion bei einer sechs Tage alten Ratte**

**Verdünnungen und Injektionsvolumina bei VAA für neonatale Ratten**

<b>Fentanyl</b>	<b>Midazolam</b>	<b>Medetomidin</b>
<b>Dosierung: 0,005mg/kg KGW</b>	<b>Dosierung: 2mg/kg KGW</b>	<b>Dosierung: 0,15mg/kg KGW</b>
Pro 10g KGW: 0,05 µg/10g	Pro 10g KGW: 20µg/10g	Pro 10g KGW: 1,5 µg/10g
Kommerzielle Fentanyl – Lösung enthält:  2ml = 0,1mg  →0,1ml = 5µg	Kommerzielle Midazolam – Lösung enthält:  1ml = 1mg	Kommerzielle Medetomidin – Lösung enthält:  1ml = 1mg  →0,1ml = 100µg

**Tabelle 14: Dosierung VAA pro 10g KGW**

Nach Empfehlung der GV-SOLAS (Gesellschaft für Versuchstierkunde) beträgt das optimale Injektionsvolumen für eine intraperitonäle Applikation bei Ratten 10 ml/kg KGW bzw. 0,1 ml/10 KGW (<http://www.gv-solas.de/index.php?id=15>). Nach Diehl et al. 2001 darf das maximale i.p. Applikationsvolumen für eine einmalige Injektion 0,2 ml/10g KGW betragen [145].

0,1 ml Flüssigkeit i.p. pro 10g Ratte, d. h. bei einer Dreifachkombination darf jeder Anteil maximal 0,03 ml betragen.

➔ 0,03 ml Fentanyl - Anteil + 0,03 ml Midazolam – Anteil + 0,03ml Medetomidin – Anteil = 0,09 ml Gesamtmenge VAA/10g Körpergewicht

Die kommerziellen Lösungen können dann z.B. folgendermaßen verdünnt werden:

	<b>Für 10g KGW</b>	<b>Hochrechnen auf:</b>	<b>Verdünnung mit 0,9% NaCl</b>
<b>Fentanyl</b>	0,03ml Fentanyl - Anteil sollen 0,05 µg Wirkstoff enthalten	3ml = 5µg	0,1 ml kommerzielle Fentanyl - Lösung enthält 5 µg Wirkstoff (siehe oben), d. h. <b>0,1 ml Fentanyl + 2,9 ml NaCl = 3 ml Gesamtverdünnung Fentanyl mit 5µg Wirkstoff</b>
<b>Midazolam</b>	0,03ml Midazolam – Anteil sollen 20 µg Wirkstoff enthalten	3ml = 2mg	1 ml kommerzielle Midazolam – Lösung enthält 1 mg Wirkstoff (siehe oben), d. h. <b>2 ml Midazolam + 1 ml NaCl = 3 ml Gesamtverdünnung Midazolam mit 2mg Wirkstoff</b>
<b>Medetomidin</b>	0,03ml Medetomidin sollen 1,5 µg Wirkstoff enthalten	3ml = 150µg	0,15 ml kommerzielle Medetomidin - Lösung enthalten 150µg Wirkstoff(siehe oben), d. h. <b>0,15 ml Medetomidin + 2,85 ml NaCl = 3 ml Gesamtverdünnung Medetomidin mit 150µg Wirkstoff</b>

**Tabelle 15: Verdünnung VAA pro 10g KGW**

Die Medikamente können dabei jeweils einzeln verdünnt und dann vermischt oder direkt gemischt und mit insgesamt 6,75 ml 0,9% Natriumchlorid-Lösung verdünnt werden. Um die gewünschte Dosierung zu erhalten, wird jedem Tier von der fertig gemischten VAA-Injektionslösung 0,1 ml pro 10g KGW intraperitonäal injiziert.

### 2.3.1.2.2. Antagonisierung

Zur Antagonisierung wurden Naloxon (Antagonisierung von Fentanyl an den Opioidrezeptoren), Flumazenil (Antagonisierung von Midazolam durch kompetitive Verdrängung an zentralen Benzodiazepin-Rezeptoren) und Atipamezol (Antagonisierung von Medetomidin durch spezifische Wirkung an zentralen und peripheren  $\alpha_2$ -Rezeptoren) verwendet.

Sämtliche Dosierungen für Ratten wurden aus Erhardt bzw. Henke et al. [144] ([http://www.mueller-heinsberg.de/Narkose\\_Nager\\_PDF.pdf](http://www.mueller-heinsberg.de/Narkose_Nager_PDF.pdf)) übernommen, bzw. gegebenenfalls durch uns an die Bedürfnisse neonataler Ratten angepasst, da hierfür in der Literatur keine Angaben zu finden sind. Die in mg/kg Körpergewicht angegebenen Dosierungen werden aufgrund des geringen Körpergewichts der neonatalen Tiere auf  $\mu\text{g}/10\text{g}$  Körpergewicht heruntergerechnet.

#### Verdünnungen und Injektionsvolumina bei VAA - Antagonisierung für neonatale Ratten

<b>Naloxon</b>	<b>Flumazenil</b>	<b>Atipamezol</b>
<b>Dosierung: 0,12mg/kg KGW</b>	<b>Dosierung: 0,2mg/kg KGW</b>	<b>Dosierung: 0,75mg/kg KGW</b>
Pro 10g KGW: 1,2 $\mu\text{g}/10\text{g}$	Pro 10g KGW: 2 $\mu\text{g}/10\text{g}$	Pro 10g KGW: 7,5 $\mu\text{g}/10\text{g}$
Kommerzielle Naloxon – Lösung enthält:  1ml = 0,4mg  →0,1ml = 40 $\mu\text{g}$	Kommerzielle Flumazenil – Lösung enthält:  1ml = 0,1mg	Kommerzielle Atipamezol – Lösung enthält:  1ml = 5mg  0,1ml = 500 $\mu\text{g}$

**Tabelle 16: Dosierung VAA - Antagonisierung pro 10g**

Nach Empfehlung der GV-SOLAS (Gesellschaft für Versuchstierkunde) beträgt das optimale Injektionsvolumen für eine intraperitonäale Applikation bei Ratten 10 ml/kg KGW bzw. 0,1 ml/10g KGW (<http://www.gv-solas.de/index.php?id=15>). Nach Diehl et

al. 2001 darf das maximale i.p. Applikationsvolumen für eine einmalige Injektion 0,2 ml/10g KGW betragen [145].

0,1 ml Flüssigkeit i.p. pro 10g Ratte, d. h. bei einer Dreifachkombination darf jeder Anteil maximal 0,03 ml betragen.

→ 0,03 ml Naloxon - Anteil + 0,03 ml Flumazenil – Anteil + 0,03ml Atipamezol – Anteil = 0,09 ml Gesamtmenge Antagonisierungslösung/10g Körpergewicht

Die kommerziellen Lösungen können dann z.B. folgendermaßen verdünnt werden:

	<b>Für 10 g KGW</b>	<b>Hochrechnen auf:</b>	<b>Verdünnung mit 0,9% NaCl</b>
<b>Naloxon</b>	0,03 ml Naloxon – Anteil sollen 1,2 µg Wirkstoff enthalten	3ml = 120µg	0,3 ml kommerzielle Naloxon – Lösung enthält 120 µg Wirkstoff (siehe oben), d. h. <b>0,3 ml Naloxon + 2,7 ml NaCl = 3 ml Gesamtverdünnung Naloxon mit 120µg Wirkstoff</b>
<b>Flumazenil</b>	0,03 ml Flumazenil – Anteil sollen 2 µg Wirkstoff enthalten	3ml = 200µg	1 ml kommerzielle Flumazenil – Lösung enthält 100 µg Wirkstoff (siehe oben), d. h. <b>2 ml Flumazenil + 1ml NaCl = 3 ml Gesamtverdünnung Flumazenil mit 200µg Wirkstoff</b>
<b>Atipamezol</b>	0,03 ml Atipamezol – Anteil sollen 7,5 µg Wirkstoff enthalten	3ml = 750µg	0,15 ml kommerzielle Atipamezol – Lösung enthält 750 µg Wirkstoff (siehe oben), d. h. <b>0,15 ml Atipamezol +2,85 ml NaCl = 3 ml Gesamtverdünnung Atipamezol mit 750µg Wirkstoff</b>

**Tabelle 17: Verdünnung VAA - Antagonisierung pro 10g**

Die Medikamente können dabei jeweils einzeln verdünnt und dann vermischt oder direkt gemischt und mit insgesamt 6,55 ml 0,9% Natriumchlorid-Lösung verdünnt werden. Um die gewünschte Dosierung zu erhalten, wird jedem Tier von der fertig gemischten Antagonisten-Injektionslösung 0,1 ml pro 10g KGW intraperitonäal injiziert.

### 2.3.1.2.3. Postoperative Analgesie

Zur postoperativen Schmerzausschaltung erhielt jedes Tier einmalig Metamizol als nichtopioides Analgetikum.

#### Verdünnung und Injektionsvolumen von Metamizol zur postoperativen Analgesie bei neonatalen Ratten

Empfohlene Dosierung für Metamizol nach Erhardt et. al. [144] : 100 mg/kg KGW

<b>Metamizol</b>
<b>Dosierung:</b> <b>100mg/kg KGW</b>
Pro 10g Tier:  1 mg/10g
Kommerzielle Metamizol – Lösung enthält:  2ml = 1g

**Tabelle 18: Dosierung Metamizol pro 10g KGW**

Nach Empfehlung der GV-SOLAS (Gesellschaft für Versuchstierkunde) beträgt das optimale Injektionsvolumen für eine intraperitonäale Applikation bei Ratten 10 ml/kg KGW bzw. 0,1 ml/10g KGW (<http://www.gv-solas.de/index.php?id=15>). Nach Diehl et al. 2001 darf das maximale i.p. Applikationsvolumen für eine einmalige Injektion 0,2 ml/10g KGW betragen.

Die kommerzielle Lösung kann dann z.B. folgendermaßen verdünnt werden:

	<b>Für 10 g KGW</b>	<b>Hochrechnen auf:</b>	<b>Verdünnung mit 0,9% NaCl</b>
<b>Metamizol</b>	0,1 ml Injektionslösung sollen 1 mg Wirkstoff enthalten	2 ml = 1000 mg	2 ml kommerzielle Metamizol – Lösung enthalten 1000 mg Wirkstoff (siehe oben), d. h. <b>2 ml Metamizol + 98 ml NaCl = 100 ml Gesamtverdünnung Metamizol mit 1mg Wirkstoff</b>

**Tabelle 19: Verdünnung Metamizol pro 10g KGW**

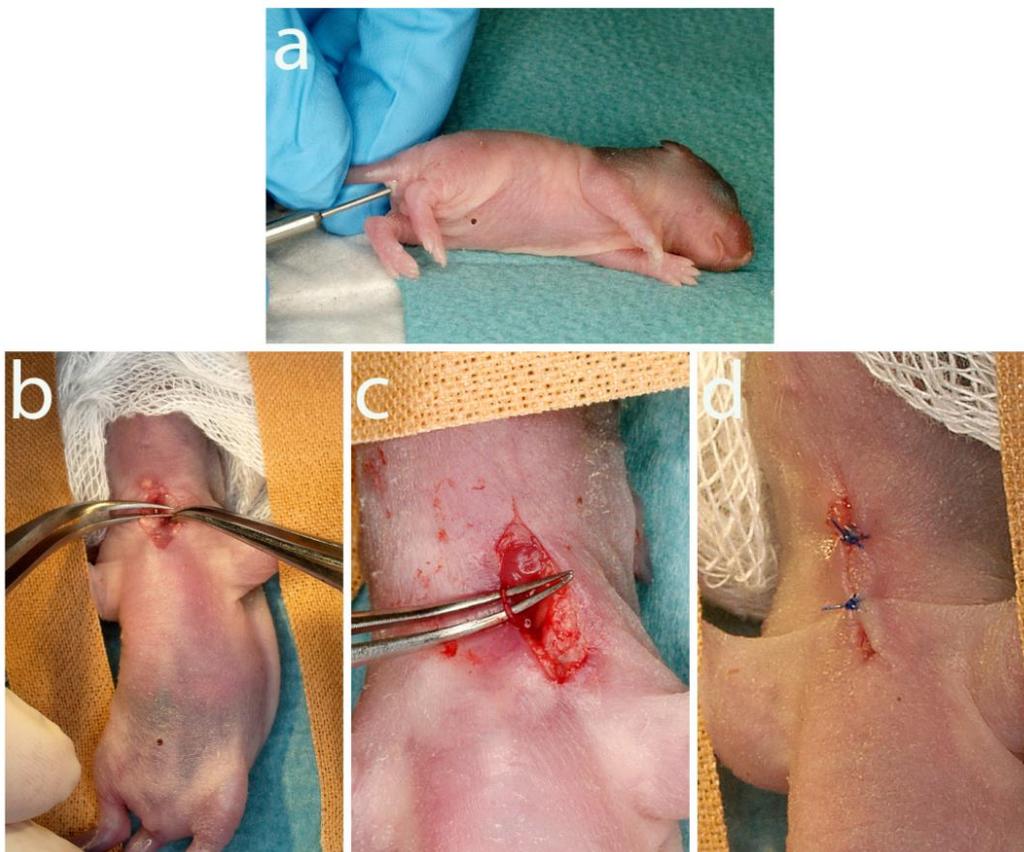
Um die gewünschte Dosierung zu erhalten, wurde jedem Tier postoperativ 0,1 ml pro 10g KGW von der verdünnten Injektionslösung intraperitonäal injiziert.

### **2.3.1.3. Unilaterale Karotisligatur**

Die UCL wurde bei allen Tieren von zwei erfahrenen Operateuren durchgeführt. Dafür wurden die Tiere zunächst narkotisiert und die Körpertemperatur prä- und post-OP mit einem Mono Channel Rodent Thermometer bestimmt (siehe Abbildung 22 (a)). Vor Beginn der OP erfolgte zur Identifizierung der einzelnen Tiere eine Markierung der Ratten mittels Tuscheinjektion in den Fußballen. Dafür wurden handelsübliche, bunte Zeichentusche und eine sehr feine, 30G Kanüle benutzt. Die Tiere wurden, wie in (b) sichtbar, mit gestrecktem Hals auf dem Rücken unter einem Zeiss Stereomikroskop gelagert, mit Leukoplast fixiert und das OP-Feld desinfiziert. Mit einem chirurgischen Einmalskalpell Cutoffix wurde auf der linken Halsseite über dem Brusteingang ein ca. 1cm langer Schnitt durch Haut und Unterhaut gesetzt (siehe (b)). Die ACC verläuft im Halsbereich parallel zur Trachea, bedeckt von Fett- und Bindegewebe, zusammen mit der Vena jugularis und dem Nervus vagus und kann von diesen beiden durch ihre Pulsation abgegrenzt werden. Nach Hervorlagerung der ACC mit Hilfe einer gebogenen Pinzette Bonn 45°(c), wurde die Arterie mit einem Elektrokauter (Deluxe High Temperature Cautery Kit) verödet, die Wunde mit Prolene 5-0 Ethicon und ein bis zwei Knopfheften verschlossen (d) und mit 0,9% Natriumchlorid und einem Wattestäbchen von Blutresten befreit.

Die Tiere wurden während der gesamten OP warm gelagert (Heizkissen oder Wärmepad) und ihre Atmung wurde ständig überwacht. Nach Beendigung der

Operation erhielten die Ratten 0,1 ml Antagonistenlösung/10g KGW i.p., entsprechend der injizierten VAA-Menge.



**Abbildung 22: Unilaterale Karotisligatur an P6**  
(a) Messung der Körpertemperatur (b) Lagerung des Tieres und OP-Feld  
(c) vorgelagerte Arteria carotis communis (d) Wundnaht

#### 2.3.1.4. Hypoxie/Hyperoxie

Nachdem sichergestellt worden war, dass die Ratten aus der Narkose wieder vollständig erwacht waren, wurden die operierten Tiere aus den Gruppen A und C einer einstündigen, 6%igen Hypoxie ausgesetzt. Dafür benutzten wir ein von der Firma Linde hergestelltes Gasgemisch aus 6% Sauerstoff und 94% Stickstoff (Abbildung 23 (a)). Das Gas wurde über einen Verbindungsschlauch und eine Befeuchtungseinheit zur Atemgasklimatisierung in eine speziell für unsere Zwecke hergestellte Hypoxiebox geleitet. Der Sauerstoffgehalt in der Box konnte permanent anhand des Luftsauerstoffgerät Gox abgelesen werden (siehe Abbildung 23 (b)). Die eigens für uns hergestellte Hypoxiebox wurde auf einer Heizmatte abgestellt und bestand, wie in (b) zu sehen, aus vier einzelnen, kleinen Schubladen, welche

luftdicht nach außen hin abschließen. Pro Schublade konnten maximal zwei Tiere für eine Stunde Hypoxie gelagert werden, der Allgemeinzustand und die Atemtätigkeit der Welpen wurden dabei über die gesamte Hypoxiedauer überwacht und protokolliert.

Nach der einstündigen Hypoxie wurden die Welpen aus der Box entnommen und Tiere aus Gruppe A zurück zur Mutter gesetzt. Tiere aus Gruppe C wurden anschließend zusammen mit den nicht operierten Tieren aus Gruppe B und einer Mutter für 24 Stunden in eine 80%ige Hyperoxie verbracht. Als Hyperoxiebox wurde dafür ein luftdichter Isolationskäfig (Isocage) der Firma Tecniplast benutzt, in welchen das Gasgemisch aus 80% Sauerstoff und 20% Stickstoff eingeleitet wurde (siehe Abbildung 23 (c)). Zur Versorgung der Rattenmutter über die 24 Stunden erhielt diese ihr gewohntes Pelletfutter sowie Trinkwasser in Gelform (Diet Gel Boost Gelwasser) und ausreichend Nistmaterial zur Lagerung der Welpen. Während der 24-stündigen Hyperoxie wurde der Zustand der Tiere mehrmals kontrolliert. Nach Ablauf der 24 Stunden wurden die Tiere wieder in ihre Käfige zurückgesetzt und im Tierhaus eingestallt.



**Abbildung 23: Hypoxie/Hyperoxie-Intervention**

(a) Versuchsschaltung mit Hyperoxie- und Hypoxie-Sauerstoffflaschen (b) Hypoxiebox mit P6 Rattenwelpen und Luftsauerstoffmessgerät (c) Hyperoxiebox mit P6 Rattenwelpen, Rattenmutter und Luftsauerstoffmessgerät

### 2.3.1.5. Angiographie

Für die Angiographie-Untersuchung wurden die 11 bzw. 21 Tage alten Ratten mit 0,1ml VAA/10g KGW narkotisiert.

Nach Einsetzen der Narkose wurde den Tieren Fluoreszein (Floureszin Alcon®) intraperitonäal appliziert. Bei dem Fluoreszeinfarbstoff handelt es sich um eine wasserlösliche, kristalline Substanz, welche nach der Injektion zu 70-80% an Blutplasmaproteine bindet und somit größtenteils in den Gefäßen verbleibt [146].

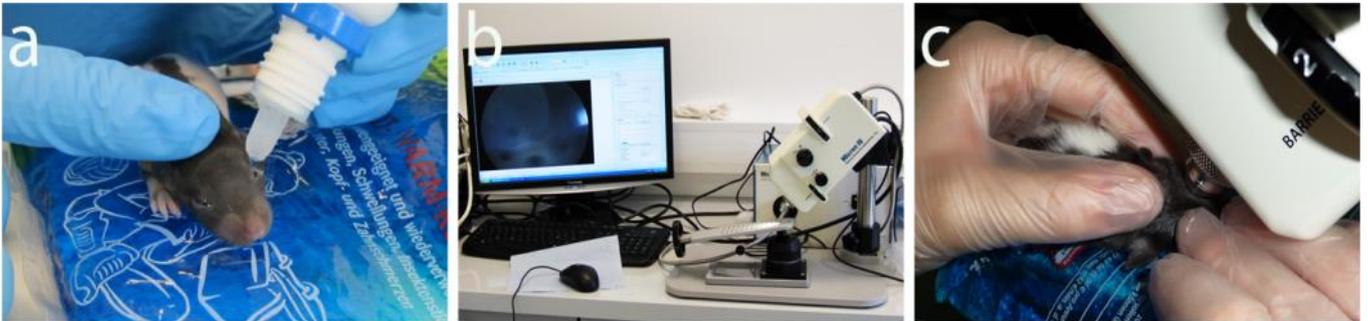
Nach Empfehlung der GV-SOLAS beträgt die Injektionsmenge 0,1 ml/10g KGW (<http://www.gv-solas.de/index.php?id=15>). Die kommerziell erworbene, 10%ige Fluoreszeinlösung (100 mg Fluoreszein/ml) wurde dafür im Verhältnis 1:10 mit 0,9% NaCl verdünnt, sodass jedes Tier pro 10g KGW 1 mg Fluoreszein in 0,1 ml Flüssigkeit erhielt.

Da die Augenlider bei elf Tage alten Tieren noch durch ein dünnes Häutchen verschlossen sind, musste dieses mit Hilfe einer Zilien- und Fadenpinzette vorsichtig und stumpf durchtrennt werden. Bei 21 Tage alten Tieren war dieses Verfahren nicht mehr notwendig. Nach dem Öffnen der Lider wurden den Tieren zur Mydriasis Temgesic-haltige, sowie Procain-haltige Augentropfen zur Lokalanästhesie der Kornea verabreicht (Abbildung 24 (a)). Außerdem erhielten die Tiere zusätzlich Methocel®-Augentropfen, welche Hydroxypropylmethylcellulose enthalten und somit das Austrocknen der Kornea verhindern.

Die Angiographie-Untersuchung konnte beginnen, sobald eine ausreichende Mydriasis vorhanden war. Die Pupille sollte dabei den Blick auf den kompletten Augenhintergrund freigeben. Dies ist bei neonatalen Tieren besonders wichtig, da bei diesen die Augen noch nicht vollständig ausgereift sind, sie sind deshalb in ihrer Konsistenz weniger prall als adulte Augen und liegen noch etwas tiefer in die Orbita eingebettet, was die Untersuchung erschwert. Zusätzlich ist bei den 11 Tage alten Tieren die Linse zu diesem Lebenszeitpunkt noch nicht völlig klar, sondern weist noch eine teilweise undurchsichtige, milchige Konsistenz auf. Diese Lichtundurchlässigkeit kann das Fluoreszenzsignal stören.

Da die FA mit der Micron III Kamera (Abbildung 24 (b)) auf einem Kontaktverfahren beruht, war eine optimale Lagerung der Tiere auf dem dafür vorgesehenen Untersuchungstisch nötig. Während der kompletten Untersuchung war es, speziell bei neonatalen Tieren nötig, diese mit Heizkissen oder Wärmepads zu wärmen, da sonst entsprechend schnell eine reversible Kataraktbildung einsetzte und Angiographie-Aufnahmen dann nicht mehr möglich waren. Zur Durchführung der Untersuchung wurden die Augen des Tieres nochmals mit Methocel® befeuchtet, der Kopf leicht zur Seite gedreht und die Kamera mittels höhenverstellbarer Schraube bis zum Kontakt mit der Kornea abgesenkt (Abbildung 24 (c)). Das Funduskop strahlt nun kurzwelliges blaues Licht ins Auge. Da Fluoreszein ein Absorptionsspektrum von 465 – 490 nm besitzt, absorbiert das in den in den Gefäßen pulsierende Fluoreszein die Photonen und emittiert daraufhin energieärmeres, grünes Licht mit Wellenlängen zwischen 520 und 530 nm [146]. Das Signal wird von der Kamera eingefangen und entsprechend mit Hilfe der Streampix Software auf einem Bildschirm dargestellt. Zur Optimierung der Bildschärfe kann die Kameralinse mittels einer Feinschraube im Millimeterbereich auf- und ab bewegt werden.

Nach Beendigung der Angiographie-Untersuchung erhielten die Tiere, entsprechend der VAA-Dosierung, 0,1ml VAA-Antagonistenlösung/10g KGW. Bis zum vollständigen Wiedererwachen aus der Narkose wurden sie dann unter Beobachtung unter einer Rotlichtlampe gelagert.



**Abbildung 24: Fluoreszenzangiographie**  
(a) Verabreichung von Augentropfen vor der Untersuchung (b) Micron III Funduskop (c) Lagerung des Tieres während der Untersuchung

### 2.3.1.6. Tiertötungen

Die Tiere wurden in Übereinstimmung mit dem aktuellen Tierschutzgesetz und nach den Richtlinien der GV-SOLAS (Gesellschaft für Tierversuchskunde) getötet.

#### 2.3.1.6.1. Dekapitation bzw. zervicale Dislokation

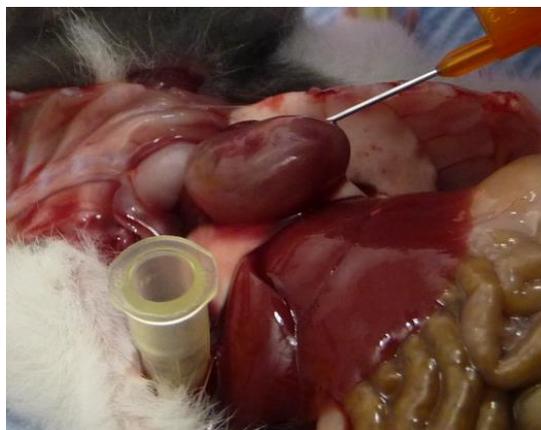
Aufgrund ihres geringen Gewichts (ca. 15g) und ihrer geringen Größe wurden Tiere an P7 ohne vorherige Betäubung durch Dekapitation mit einer Aesculap Schere getötet. Dies stellt für Ratten dieses Alters die effizienteste und stressfreieste Tötungsmethode dar.

An P11 und P21 sind die Tiere teilweise für einen einfachen Scherenschlag zu groß, sodass sie (für molekularbiologische Untersuchungen) eine leichte Isofluran-Inhalationsnarkose erhielten und anschließend durch zervicale Dislokation getötet wurden. Bei dieser Tötungstechnik wird durch ruckartiges Ziehen am Hinterleib und gleichzeitiger Fixierung des Kopfes das Rückenmark am Übergang zum Stammhirn durchtrennt, sodass der Tod des Tieres sichergestellt ist. Diese Technik darf nur von sachkundigen und dazu befugten Personen durchgeführt werden.

### 2.3.1.6.2. PFA - Perfusion

Für immunhistochemische Untersuchungen an P11 und P21 mussten die Tiere mit Paraformaldehyd unter einem Abzug perfundiert werden. Dabei wird eine Konservierungslösung (4% PFA) durch den Blutkreislauf der Ratte gepumpt, um so die Organe zu fixieren und haltbar zu machen. Die Fixierung geschieht dabei über Vernetzung der zellulären Strukturen und entspricht im Prinzip einer Denaturierung des Gewebes, bei der die Funktion zerstört, aber die Primärstruktur erhalten bleibt [147].

Zur Betäubung wurden jeweils 0,2ml VAA/10g KGW i.p. injiziert, bis eine tiefe Sedation und Hypnose eintrat. Das Tier wurde sodann mit dem Rücken auf einer Styroporplatte gelagert und die Füße mit 20G Kanülen auf dem Styropor festgepinnt. Mit einer feinen Irisschere (Fine Iris Scissors, F.S.T. Heidelberg) wurde sodann die Haut vom Bauchnabel aufwärts bis hoch zum Brusteingang eröffnet und das Zwerchfell sowie beide Rippenbögen seitlich durchtrennt. Das nun frei liegende, noch schlagende Herz wurde in der linken Herzkammer mit einer Butterfly Kanüle punktiert (Abbildung 25). Über einen Verbindungsschlauch (Mutifly Kanülenset, Sarstedt) wurde dann mit der Injektion von 15 ml 1x PBS begonnen, um vor der Perfusion das Blut aus dem Gefäßsystem zu entfernen. Um den Blutaustritt zu ermöglichen, wurde mit einer feinen Irisschere das rechte Herzohr eröffnet. Die 15 ml sollten innerhalb von ca. 3 min injiziert werden. Danach wurden, ebenfalls innerhalb von ca. 3 min, 15 ml 4% PFA injiziert. Danach wurden die Organe entnommen.



**Abbildung 25: PFA-Perfusion**  
Punktion des linken Ventrikels

### **2.3.1.7. Augenentnahme und Augenpräparation**

#### **2.3.1.7.1. Immunhistochemie**

Die Augenentnahme erfolgte nach Feststellung des Todes. Die Augenentnahme und -präparation für immunhistochemische Untersuchungen ist aufwendiger und komplizierter als selbige für molekularbiologische Untersuchungen.

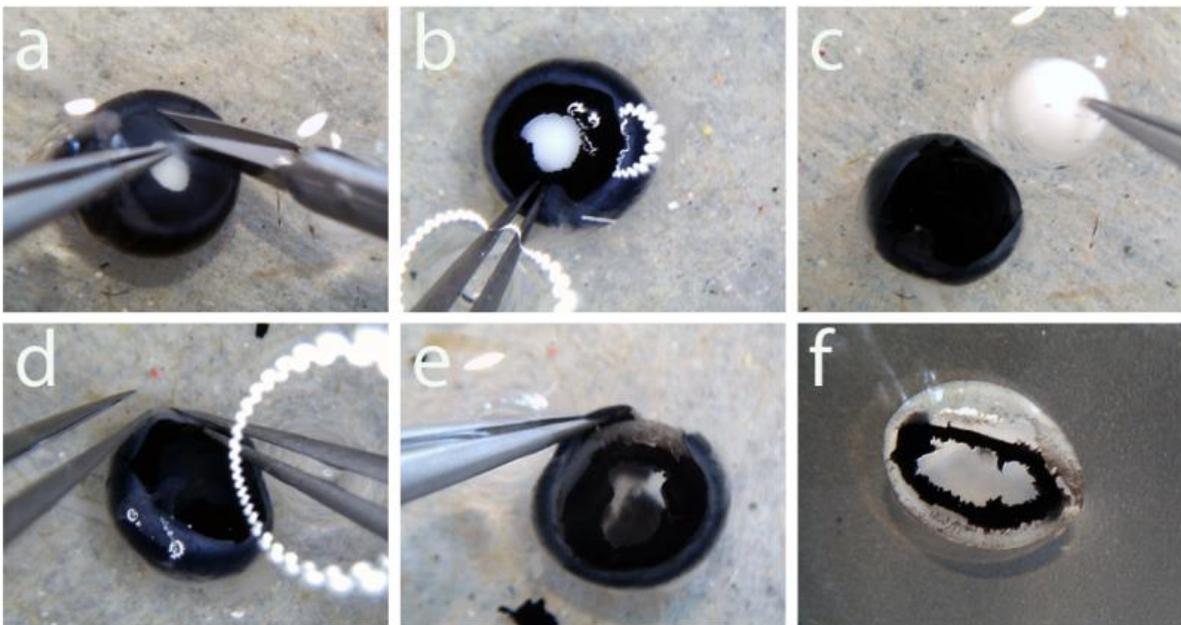
Da die Richtungsorientierung am Auge wichtig war, musste dieses vor der E nukleation markiert werden. Dafür wurde mit einem extrem gut haftenden, wasserfesten, roten Folienstift (Lumocolor® permanent, Staedtler) eine deutliche Markierung auf Höhe des dorsalen/superioren Pupillenrands auf die Kornea gesetzt. Die Markierung musste entsprechend stark sein, um die auf die E nukleation folgende, zusätzliche Fixierung zu überdauern und auch danach noch sichtbar zu sein.

Nach Markierung wurden mit Hilfe der Zilien- und Fadenpinzette die Augenlider zurückgeschoben, das Auge aus der Orbita gehoben und kurz hinter Austritt des Sehnervs mit einer gebogenen Schere abgesetzt. Durch kurzes Spülen in 0,1M PB wurden eventuell vorhandene Blut- und Haarreste entfernt.

Das Auge wurde dann, zusätzlich zur Perfusion, nochmals in PFA fixiert (siehe 2.3.1.8.1.), erst danach konnte die Augenpräparation stattfinden. Während des gesamten Entnahme-, Fixierungs- und Präparationsprozesses sollte das Auge bzw. die Netzhaut stets in deutlich und wasserfest beschrifteten Eppendorfgefäßen aufbewahrt werden. Nach der zweistündigen Zusatzfixierung wurde die Neuroretina im Ganzen aus dem Auge herauspräpariert. Es war von großer Bedeutung, die Netzhaut dabei nicht zu beschädigen, da diese später im Ganzen gefärbt und untersucht werden sollte.

Die Augenpräparation fand in einer mit 0,1M PB gefüllten Petrischale unter einem Binokular (SMZ 168 von Motic) statt. Zur besseren Greifbarkeit des Auges wurde die Petrischale außerdem mit einem Stück handelsüblichen Papierhandtuch ausgelegt. Das Auge hatte durch die starke PFA-Fixierung seine pralle Konsistenz verloren, die Kornea war nicht mehr klar sondern wies eine milchige Färbung auf. Mit einer feinen Pinzette (Dumont #5 Forceps) wurde die Kornea fixiert und mit einer feinen Irisschere (Vannas Spring Scissors - 3mm Blades) ein kreisrunder Schnitt auf Höhe der *Ora serrata* durchgeführt (siehe Abbildung 26 (a)). Nach Entfernung der Kornea sollte die

superior mit Permanentmarker gesetzte Markierung immer noch sichtbar sein. In diesem Bereich wurde, senkrecht in Richtung des posterioren Augenteils, ein Schnitt durch Sklera und Netzhaut gesetzt, um den superiorsten Punkt der Retina durch diesen Einschnitt zu markieren. Danach wurde das Auge mit der #5 Pinzette an der Sklera fixiert und mit einer noch feineren Pinzette (Dumont #55 Forceps) die weiß gefärbte Linse entfernt (c). Mit der Hilfe der beiden feinen Pinzetten wurde nun die Retina bzw. die *Ora serrata* von der Sklera abgelöst. Dazu wurde ein Pinzettenschenkel zwischen Retina und Sklera geschoben und durch Entlangfahren an der Kante die Verbindung kreisrund getrennt (d). War die *Ora serrata* vollständig umrundet, ließ sich die Sklera leicht durch stumpfes Voranpräparieren von der Retina lösen (e). Die fixierte Netzhaut nimmt nach der Präparation gern die Form einer Muschel an und wird als *retinal wholemout* bezeichnet (f).



**Abbildung 26: Isolation der Neuroretina aus einem 11 Tage alten Rattenauge**

**(a)** Einschneiden der Kornea **(b)** Auge ohne Kornea **(c)** Entfernung der Linse **(d)** Trennen der Verbindung zwischen Sklera und *Ora serrata* **(e)** Entfernung des Augenbeckens (Sklera) **(f)** *retinal wholemout*

### **2.3.1.7.2. Molekularbiologie**

Technisch lief die Freipräparation der Netzhaut für molekularbiologische Untersuchungen genauso ab, wie in 2.3.1.7.1. beschrieben. Da die Netzhaut hier jedoch im Rahmen der Weiterverarbeitung zur RNA-Extraktion ohnehin homogenisiert wurde, war bei diesen Proben weder auf eine Richtungsorientierung innerhalb der Netzhaut noch auf eine beschädigungsfreie Präparation zu achten. Dafür war hier im Hinblick auf die RNA-Qualität besonders schnelles und vor allem sauberes Arbeiten wichtig.

### **2.3.1.8. Augenkonservierung und –lagerung**

#### **2.3.1.8.1. Für Immunhistochemie**

Nach der Eukleation wurde das superior markierte Auge in einem 2ml-Eppendorfgefäß für zwei Stunden bei Raumtemperatur in 4% PFA fixiert, um die empfindliche Netzhaut möglichst haltbar und stabil zu machen. Diese äußerst lange Fixierungszeit kann jedoch nur bei einer geplanten Immunfärbung mit äußerst zuverlässig und gut bindenden Antikörpern angewendet werden, da es durch die entstehenden Proteinvernetzungen zu einer Maskierung von Antigenen in der Retina kommt und empfindliche Antikörper ihre Bindungsstelle dann nicht mehr erkennen.

Nach Ablauf der zwei Stunden wurde das Auge mehrmals in 0,1M PB gespült, anschließend konnte mit der Präparation begonnen werden (siehe 2.3.1.7.1.).

Nach der Präparation lag die Netzhaut als *wholemout* frei und war entsprechend empfindlich. Zur Überführung konnte sie deshalb in Flüssigkeit mit einer abgeschnittenen Plastik-Einmalpasteurpipette eingesaugt und so ohne Beschädigung in ein anderes Gefäß transportiert werden.

Um den *wholemout* für spätere Färbungen zu konservieren, wurde den Zellen mit Hilfe einer Sucrosereihe (Herstellung siehe 2.2.2.) das Wasser entzogen. Die Sucrose stellt einen Gefrierschutz dar, welcher die Bildung von Wasserkristallen beim Einfrieren verhindert. Die Netzhäute wurden dafür bei Raumtemperatur für eine Stunde in einem 2ml Eppendorfgefäß mit 10%iger, für eine weitere Stunde in einem

Eppendorfgefäß mit 20%iger und über Nacht bei 4°C in 30%iger Sucroselösung mit 0,02% Natriumazid belassen. Am nächsten Tag konnten die *wholemounds* in der 30%igen Sucrose bei -20°C eingefroren werden.

#### **2.3.1.8.2. Für Molekularbiologie**

Die Konservierung der Netzhäute für molekularbiologische Untersuchungen war weniger aufwendig. Nach entsprechender Präparation wurden die Retinae direkt in sterile und mit RNA-Later gefüllte 2ml Eppendorfgefäße verbracht und bis zur RNA-Extraktion bei -20°C eingefroren.

Da RNA nach dem Zelltod extrem schnell durch ubiquitär vorkommende RNasen degradiert wird, ist eine entsprechende Stabilisierung in RNA Later nötig. Das Agens enthält RNase-Inhibitoren und ermöglicht bei -20°C eine Konservierung von Gewebe ohne RNA-Degradation für mehrere Monate.

### **2.3.2. In vitro Versuche**

#### **2.3.2.1. Immunhistochemische Methoden**

##### **2.3.2.1.1. Immunfluoreszenzfärbung *flatmount***

Das Prinzip der Immunfluoreszenz-Färbung beruht auf einer Antikörper-Antigen-Reaktion. Der Primärantikörper wird dabei in einer bestimmten Spezies vermehrt (z.B. Maus). Im Rahmen der Färbung erkennt er spezifische Epitope (z.B. mouse-anti-GFAP) in dem zu analysierenden Gewebe und bindet daran. Um diese Reaktion sichtbar zu machen, ist ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper nötig. Er wird häufig in Kaninchen oder Eseln hergestellt und muss gegen ein bestimmtes Fragment des Primärantikörpers gerichtet sein (donkey-anti-mouse). Nachdem der Sekundärantikörper im Gewebe an den Primärantikörper gebunden hat, können die zu untersuchenden Strukturen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops dargestellt werden.

Das Prinzip ist dabei ähnlich zur FA. Das Mikroskop strahlt kurzwelliges, energiereiches Licht aus, welches als erstes durch den sog. Anregungsfilter fällt. Dieser wird passend zum jeweiligen Fluorochrom des Sekundärantikörpers ausgewählt und lässt nur Wellenlängen hindurch, welche in der Lage sind, die Fluorochrome anzuregen. Von den Fluorochromen des Sekundärantikörpers wird das eingefallene Licht absorbiert und als langwelliges, energieärmeres Licht emittiert. Abhängig von Absorptions- und Emissionsspektrums der Fluorochrome fluoresziert die zu untersuchende Struktur dann unter dem Mikroskop in unterschiedlichen Farben [\[http://www.dako.com/de/index/knowledgecenter/kc\\_publications/kc\\_publications\\_edu/immunohistochemical\\_staining\\_methods.htm\]](http://www.dako.com/de/index/knowledgecenter/kc_publications/kc_publications_edu/immunohistochemical_staining_methods.htm).

Bei dem verwendeten Isolectin (Isolectin GS-IB4 From *Griffonia simplicifolia*, Alexa Fluor® 488 Conjugate) handelt es sich um ein Protein, welches aus der afrikanischen Leguminose *Griffonia simplicifolia* isoliert wird. Das verwendete Lektin ist kommerziell bereits fluoreszenzmarkiert erhältlich und benötigt somit keinen extra Sekundärantikörper. Es dient als robuster Marker für Endothel- und Mikrogliazellen [148].

Zusätzlich wurden Primärantikörper gegen GFAP (*Rabbit anti-glia fibrillary acidic protein* (GFAP), polyklonaler Antikörper) und Ng2 (*Mouse anti-Ng2 antibody*, monoklonaler Antikörper) mit den jeweiligen Sekundärantikörpern Alexa Fluor® 594 Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) und Alexa Fluor® 647 Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) verwendet. GFAP wird in den Intermediärfilamenten retinaler Gliazellen exprimiert [15] und ist ein selektiver Marker für retinale Astrozyten [84] [20], während das Proteoglykan Ng2 hauptsächlich auf der Zelloberfläche von Perizyten zu finden ist [149] [38].

Wie bereits angesprochen, ist der Einsatz von Paraformaldehyd zur Fixierung nicht ganz unproblematisch. PFA führt über die Vernetzung von Proteinen zur Fixierung und Denaturierung von Zellstrukturen, wodurch Antigene von ihren Antikörpern teilweise nicht mehr erkannt werden können [147]. Im Ergebnisteil wird deutlich, dass die hier angewendete, zweistündige PFA-Fixierung der Netzhäute die Isolectin-Färbung zwar nicht beeinträchtigt, jedoch aber die Färbungen mit GFAP und Ng2.

### 2.3.2.1.1.1. Färbeprotokoll

Zu Beginn der Färbung mussten die in 30% Sucrose + 0,02% Natriumazid bei -20° eingefrorenen *wholemounds* bei 4°C langsam aufgetaut werden. Die gesamten Färbungen fanden auf dem Wipptisch bei Raumtemperatur und im 2ml Eppendorfgefäß statt, wobei pro Gefäß und Netzhaut stets 500 µl der entsprechenden Flüssigkeit verwendet wurden. Die Lösungen wurden mit Hilfe von Einmalpipetten und feineren 200 µl-Pipetten (Brandt) gewechselt.

- Nach dem Auftauen **4 x 15 min in 0,1M PB** waschen
  
- **2 h in Blocklösung**; die Blocklösung enthält einen hohen Anteil an Triton-X-100. Dieses Detergenz führt zu einer Permeabilisierung der Zellmembranen, indem es mit deren Fetten sog. Mizellen bildet [150], und ermöglicht dadurch dem später eingesetzten Antikörper eine bessere Penetration des Gewebes und dadurch verbesserte Antigendetektion.
  
- **2 d in Inkubationslösung mit Primärantikörpern:**  
Isolectin GS-IB4, Alexa Fluor® 488 konjugiert, 1:100  
*Rabbit anti-glia fibrillary acidic protein (GFAP)* Antikörper, 1:1000  
*Mouse anti-Ng2* Antikörper, 1:100  
Zum Anfertigen von 500 µl Inkubationslösung mit Primärantikörpern benötigt man demnach 5 µl Isolectin B4, 0,5 µl GFAP sowie 5 µl Ng2. Diese kleinen Mengen wurden in 489,5 µl Inkubationslösung pipettiert und waren für jeweils ein Eppendorfgefäß mit einer Netzhaut bestimmt. Während der zweitägigen Inkubationszeit wurde die Inkubationslösung mehrmals täglich auf- und abpipettiert und der Füllungszustand des Gefäßes überprüft. Ab diesem Schritt müssen die Gefäße mit den Netzhäuten stets im Dunklen auf dem Schüttler stehen, da ansonsten der an das Isolectin gekoppelte Fluoreszenzantikörper ausbleicht.
  
- **3 x 15 in 0,1M PB** waschen

- **1h in Inkubationslösung mit Sekundärantikörpern:**

Alexa Fluor® 594 *donkey anti-rabbit IgG (anti rabbit GFAP)*, 1:500

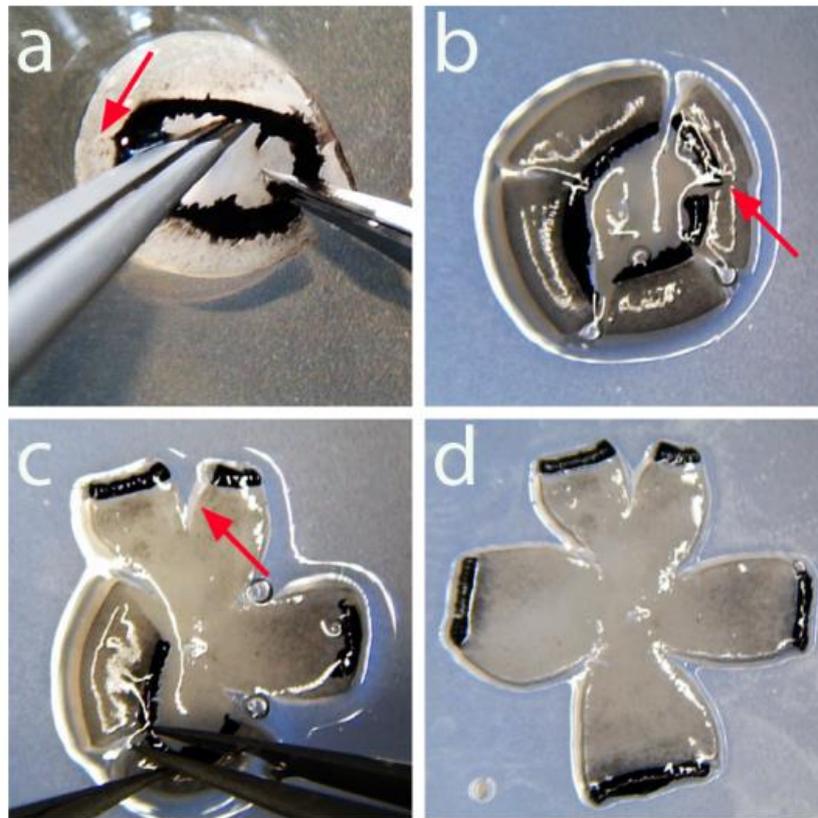
Alexa Fluor® 647 *donkey anti-mouse IgG (anti mouse Ng2)*, 1:500

Zum Anfertigen von 500 µl Inkubationslösung mit Sekundärantikörpern für GFAP und Ng2 (Isolectin ist bereits mit Alexa 488 konjugiert) benötigt man demnach 1 µl Alexa Fluor® 594 sowie 1 µl Alexa Fluor® 647. Diese kleinen Mengen wurden in 498 µl Inkubationslösung pipettiert und waren für jeweils ein Eppendorfgefäß mit einer Netzhaut bestimmt. Die markierten Strukturen waren im Fluoreszenzmikroskop dann in grün (Isolectin B4 mit Alexa 488, Endothelzellen), hellrot (GFAP mit Alexa 594, retinale Astrozyten) und dunkelrot (Ng2 mit Alexa 647, Perizyten) zu sehen.

- **3 x 15 min in 0,1M PB waschen**

#### **2.3.2.1.1.2. Eindeckeln kompletter Netzhäute**

Die nun als gefärbte *wholemounds* vorliegenden Retinae wurden nach der Färbung als sog. *flatmounts* auf Superfrost® Plus Objektträgern eingedeckelt. Dazu wurden sie mittels einer abgeschnittenen Einmalpipette in einem Tropfen 0,1M PB auf den Objektträger überführt und seitlich viermal in etwa gleichem Abstand zueinander eingeschnitten (siehe Abbildung 27). Überschüssiges PB wurde mit einer Pipette oder einem Papier-Einmalhandtuch abgesaugt und die vier einzelnen Blätter der *flatmounts* mit Hilfe zweier feiner Pinzetten ausgebreitet (Abbildung 27 (c) und (d)). Abschließend wurden die Gewebe mit 2-3 Tropfen Fluorescent Mounting Medium überschichtet und mit einem Deckglas (Automatic Star Deckgläser 24x50 mm) abgedeckt. Eventuell vorhandene Luftblasen wurden durch leichtes Drücken entfernt. Die gefärbten *flatmounts* wurden im Dunklen bei 4°C aufbewahrt.



**Abbildung 27: Präparation eines flatmounts**

**(a)** Einschneiden des *wholemounts* **(b)** Netzhaut mit vier Einschnitten plus superiorer Markierung, dieser Einschnitt ist weniger tief als die anderen vier (Pfeil) **(c)** Ausklappen der einzelnen Blätter mit zwei feinen Pinzetten **(d)** *retinal flatmount*

### 2.3.2.1.2. Gefäßanalysen

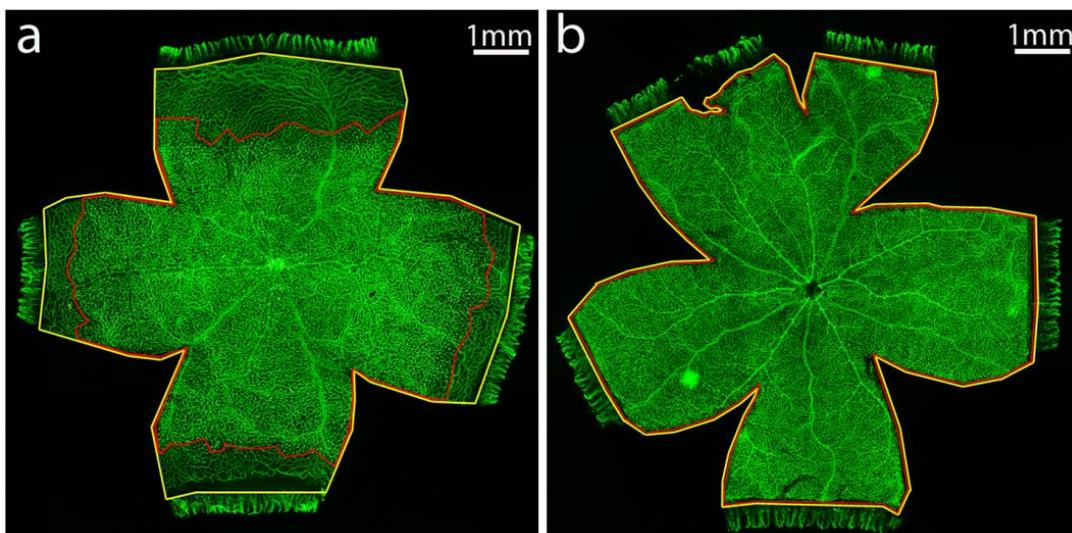
Die in 3.1.4. aufgeführten Gefäßanalysen wurden allesamt auf Isolectin B4 gefärbten *flatmounts* mit Hilfe des Fluoreszenz-Mikroskops Biozero (Firma Keyence) und der passenden Aufnahme- und Analysesoftware (Biozero II Viewer Software, Biozero II Analyzer Software) in 8-facher Vergrößerung mit entsprechendem Zoom angefertigt. Zur Ermittlung der Ergebnisse wurden die Retinae aus insgesamt vier Versuchsrunden ausgemessen. Es handelte sich dabei insgesamt um 60 Netzhäute, davon 32 an P11 und 28 an P21. An P11 wurden damit für A-L, A-R, C-L und C-R jeweils vier Netzhäute analysiert, für die Gruppen B und D entsprechend die doppelte Anzahl (acht Stück), da hier keine Seitenunterschiede vorgenommen werden mussten. Für P21 gelten diese Werte ebenso (Ausnahmen: Gruppe C, hier jeweils

nur drei anstatt vier Augen insgesamt und Gruppe D, hier nur sechs anstatt acht Augen insgesamt).

### 2.3.2.1.2.1. Expansion des tiefen Gefäßplexus

Zur Bestimmung der Ausdehnung des tiefen Gefäßplexus wurde in einer Übersichtsaufnahme mit Hilfe des Flächen-Messtools die Gesamtfläche der jeweiligen Netzhaut sowie die Ausdehnung des tiefen Gefäßplexus bestimmt (siehe Abbildung 28). Mit diesen Werten wurde dann berechnet, wie viele Prozent der Netzhaut an P11 bzw. an P21 bereits mit der tiefen Gefäßschicht bedeckt waren.

Für jede Gruppe wurde der Mittelwert aus einem Versuch (sprich der jeweilige Mittelwert für den tiefen Plexus und die retinale Gesamtfläche für eine Netzhaut, z.B. für A-L) und aus den vier entstandenen Werten dann der jeweilige Gesamtmittelwert für A-L berechnet.

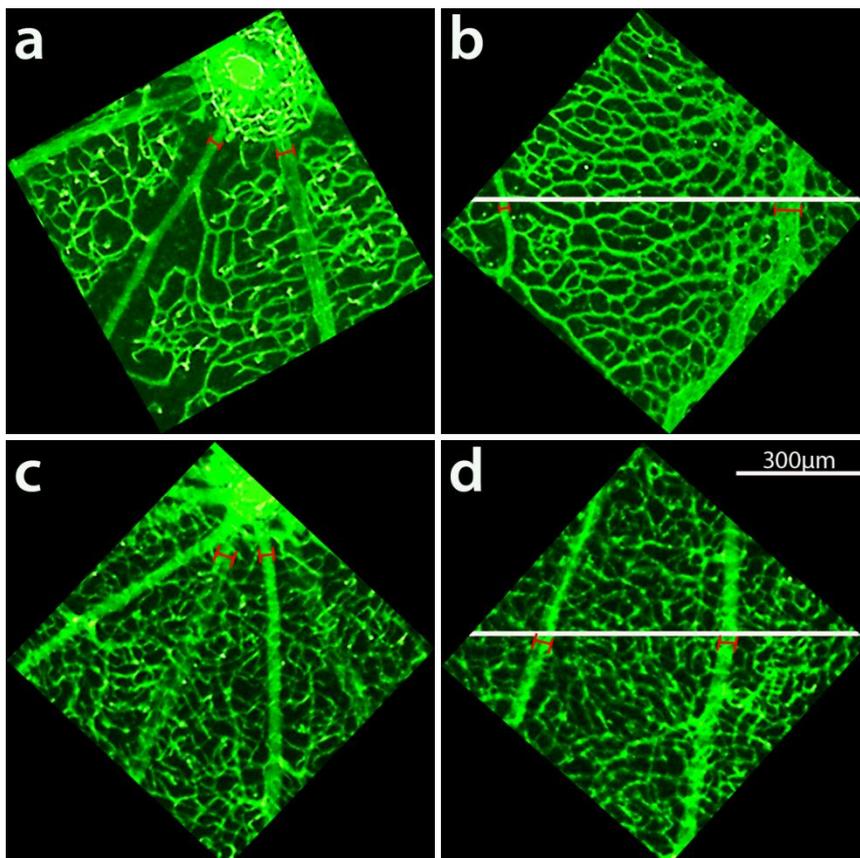


**Abbildung 28: Expansionsmessung des tiefen Gefäßplexus**

Die Ausdehnung des tiefen Gefäßplexus (rote Linie) wird in Relation zur retinalen Gesamtfläche (gelbe Linie) bestimmt; (a) P11 (b) P21

### 2.3.2.1.2.2. Durchmesser der großen Gefäße

Zur Ermittlung des Durchmessers der großen Gefäße wurden an P11 und P21 Arterien und Venen mit einem Durchmesser von  $>20\ \mu\text{m}$  herangezogen und deren Kaliber jeweils zentral (direkt nach dem Austritt aus der Papille) und in mittlerer Peripherie (auf halber Strecke zwischen Papille und *Ora serrata*) mittels des Entfernungsmesstools bestimmt (siehe Abbildung 29). Bei jeweils mindestens fünf großen Arterien und fünf großen Venen pro Netzhaut erhielt man somit bei im Schnitt vier (bzw. acht bei Gruppe B und D) Netzhäuten pro Gruppe insgesamt etwa jeweils 20 Werte für den zentralen und 20 Werte für den mitt-peripheren Arterienradius, und ebenfalls 20 Werte für den zentralen und 20 Werte für den mitt-peripheren Venenradius an P11 (bzw. jeweils 40 Werte für den zentralen und mitt-peripheren Arterien- und Venenradius für B und D) und dasselbe an P21. Aus den Messungen wurden dann die entsprechenden Mittelwerte pro Versuch und aus diesen vier Mittelwerten dann der jeweilige Endwert berechnet.

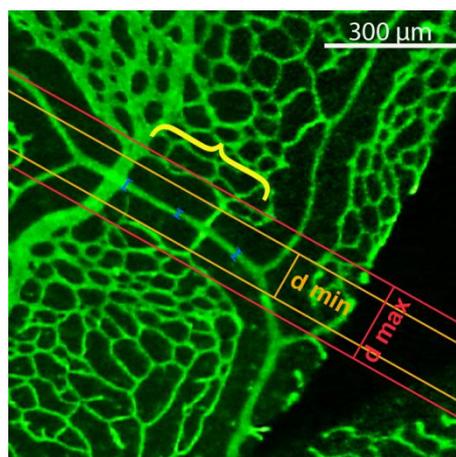


**Abbildung 29: Gefäßdurchmesser großer retinaler Arterien und Venen (a),(b) P11 und (c),(d) P21;** Die Abbildungen (a) und (c) zeigen jeweils den zentralen Netzhautbereich; links die Arterie, rechts die Vene; die Abbildungen (b) und (d) zeigen jeweils den mitt-peripheren Netzhautbereich; links die Arterie, rechts die Vene; rote Markierung: Gefäßdurchmesser

### 2.3.2.1.2.3. Periarteriell gefäßfreie Bereiche (PGB)

Zur Bestimmung der PGB wurde im mittleren Drittel der Netzhaut (mittlere Peripherie) ein 300  $\mu\text{m}$  langes, möglichst gerade verlaufendes Arterienstück aufgesucht. Am Anfang, in der Mitte und am Ende dieser 300 $\mu\text{m}$  wurde jeweils der Gefäßdurchmesser (GD) der Arterie bestimmt und der Mittelwert des GD für dieses Stück berechnet. Mittels der Parallelenfunktion wurde außerdem jeweils der maximale (links und rechts von der Arterie am weitesten entfernte Kapillare auf dem 300  $\mu\text{m}$  Stück) und der minimale Abstand (links und rechts von der Arterie am nächsten gelegene Kapillare auf dem 300  $\mu\text{m}$  Stück) des gefäßfreien Bereichs bestimmt (siehe Abbildung 30). Aus dem gemessenen maximalen und minimalen Abstand wurde dann der Mittelwert berechnet und vom Ergebnis der jeweilige GD abgezogen, um schließlich den reinen PGB-Wert zu erhalten. Da eine Aussage über den PGB ohne Betrachtung des jeweiligen GD nicht möglich ist, wurde abschließend der Quotient aus PGB und GD berechnet, je größer dieser ist, desto größer ist auch der periarteriell gefäßfreie Bereich.

Bei vier (bzw. acht) Netzhäuten pro Gruppe und ca. fünf Arterien pro Netzhaut wurden somit pro Gruppe ca. 20 PGB und GD (bzw. 40) Werte für P11 ausgemessen und ausgewertet. Für jede Gruppe wurde der Mittelwert aus einem Versuch (sprich der Mittelwert für eine Netzhaut, z.B. für A-L) und aus den vier entstandenen Werten der Gesamtmittelwert an P11 für A-L berechnet.



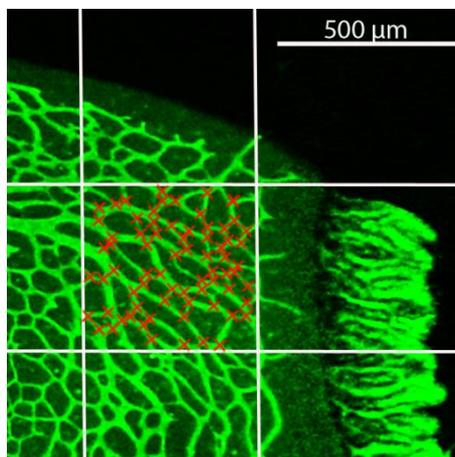
**Abbildung 30: Bestimmung von PGB und GD, P11**

Die gelbe Klammer markiert das ausgewählte, 300 $\mu\text{m}$  lange Arterienstück; in blau sind die drei Messpunkte für den GD angezeichnet; die beiden roten Linien zeigen den maximalen PGB auf dem 300 $\mu\text{m}$ -Stück an, die orangefarbenen Linien den minimalen PGB

#### 2.3.2.1.2.4. **Branching Points (BP)**

Zur Bestimmung der BP auf einem Quadratmillimeter Netzhaut wurde die Methode von Lobov et al. [32] leicht modifiziert. Eine Fläche von 500 µm x 500 µm (1mm<sup>2</sup>) an der vaskulären Front bzw. der *Ora serrata* (je nachdem, wie weit das Gefäßwachstum an P11 schon fortgeschritten war) wurde an vier Stellen der Netzhaut im Bereich der venösen Aufzweigung ausgezählt. Gezählt wurden dabei die kapillären Verschaltungen des oberflächlichen Plexus: Ein Kreuz wurde dort gesetzt, wo sich drei Kapillaren treffen, zwei Kreuze dort, wo sich vier Kapillaren treffen usw. (siehe Abbildung 31).

Zur Ermittlung der Anzahl an BP und somit des Reifezustands des retinalen Gefäßsystems wurden nur Netzhäute von P11 herangezogen, da die Entwicklung der Gefäße an P21 schon zu weit vorangeschritten war. Beurteilt wurden jeweils vier (bzw. acht) Netzhäute pro Gruppe mit vier 1mm<sup>2</sup>-Feldern pro Netzhaut, was pro Gruppe ca. 16 (bzw. 32) Werte ergab. Für jede Gruppe wurde der Mittelwert aus einem Versuch (sprich der Mittelwert für eine Netzhaut, z.B. für A-L) und aus den vier entstandenen Werten der Gesamtmittelwert für A-L berechnet.



**Abbildung 31: Quantifizierung der BP, P11**  
BP (rote Kreuze) auf 1mm<sup>2</sup> Netzhaut (P11) an vaskulärer Front im Bereich der venösen Aufzweigung

#### **2.3.2.1.2.5. Lokale Gefäßpathologien**

Zur Quantifizierung der lokalen Gefäßpathologien wurden insgesamt 60 Netzhäute herangezogen, 32 an P11 und 28 an P21. Die verschiedenen Gefäßpathologien wurden bezüglich der Häufigkeit ihres Vorkommens bewertet werden, nicht bezüglich ihres Ausprägungsgrades.

Sie wurden bei 8-facher Vergrößerung und wenn nötig entsprechendem Zoom identifiziert und in tabellarischer Form für alle Gruppen an P11 und P21 festgehalten.

#### **2.3.2.1.3. Kryoschnitte**

Die Untersuchung von Kryoschnitten der Versuchsnetzhäute diente zur besseren Visualisierung des oberflächlichen und tiefen Gefäßplexus und vor allem deren Ausbreitung an P11 nach peripher. Die Herstellung der Kryoschnitte aus bereits gefärbten und analysierten *flatmounts* machte den direkten Vergleich zwischen Aufsichts- und Vertikaldarstellung des retinalen Gefäßsystems am selben Präparat möglich.

##### **2.3.2.1.3.1. Herstellung von Kryoschnitten**

Zur Herstellung der Kryoschnitte wurden die gefärbten, eingedeckelten und mikroskopierten *flatmounts* aus einer Versuchsrunde über Nacht bei Raumtemperatur in 0,1M PB eingelegt. Am nächsten Tag ließen sich die Deckgläser problemlos entfernen und die Netzhäute von den Objektträgern ablösen. Die Netzhäute blieben dabei vollkommen erhalten, durch das Eindeckeln waren sie nun jedoch weniger dick als native Netzhäute. Mit Hilfe einer feinen Pinzette und einer feinen Schere wurde aus dem kleeblattförmigen *flatmount* das inferiore Viertel von der Papille bis zur *Ora serrata* herausgeschnitten, sodass die Darstellung der retinalen Gefäßschichten im Kryoschnitt der inferioren Netzhaut auf ganzer Länge - von zentral bis peripher – möglich war.

Die *flatmounts* wurden sodann in Einbettformen (Cryomold Biopsy 4565 Tissue Tek®) auf etwas Leica Gefriereinbettmedium flach ausgebreitet und mit selbigem bedeckt, bis die Formen komplett gefüllt waren. Sie wurden dann bei -20°C eingefroren.

Zum Anfertigen der Kryoschnitte selbst wurde ein Kryostat Leica CM3050 verwendet. Das jeweilige gefrorene Blöckchen wurde mit Hilfe von etwas Gefriereinbettmedium so auf einen Kryostatstempel geklebt, dass die Retina von der zentralen Papille bis zur *Ora serrata* auf ganzer Länge durchgeschnitten wurde. Die Schnittdicke betrug dabei 20 µm. Jeweils drei Retinaschnitte wurden auf einem Superfrost Objektträger aufgenommen und bei -20°C gelagert.

#### **2.3.2.1.3.2. Färbeprotokoll**

Die Färbung der Gefrierschnitte fand in einer dunklen, mit feuchten Tüchern ausgelegten Box bei Raumtemperatur (RT) statt.

- Schnitte vom -20°C – Eisfach direkt in eine Küvette mit 0,1M PB verbringen und dort **3 x 10 min waschen**
- Nach dem Herausnehmen und vorsichtigen Abtupfen der Objektträger mit einem Papierhandtuch jeden einzelnen Schnitt mit einem **Dako Fettstift für Gefrierschnitte umranden**, um ein Ineinanderlaufen bzw. Austrocknen der Flüssigkeiten zu verhindern (jeweils drei Retinaschnitte auf einem Objektträger)
- **Inkubationslösung mit Primärantikörper über Nacht bei RT:**  
Isolectin GS-IB4, Alexa Fluor® 488 konjugiert, 1:100  
Pro Kringel werden etwa 70-100 µl Inkubationslösung benötigt. Zum Ansetzen von 100 µl pipettierte man dementsprechend 1 µl Isolectin in 99 µl Inkubationslösung und gibt die Mischung vorsichtig auf den Retinaschnitt. Für die Inkubationszeit über Nacht müssen die Schnitte aufgrund der Ausbleichgefahr von Alexa Fluor® 488 im Dunklen aufbewahrt werden.

- Am nächsten Tag Objektträger in der Küvette **3 x 10 min in 0,1M PB waschen**
- **3 min DAPI, 1:500**  
 Zum Ansetzen der DAPI-Verdünnung wurde die Originallösung (DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol, Dihydrochlorid) von Life Technologies) 1:1000 verdünnt und aus dieser Stammlösung dann eine Gebrauchslösung mit einer Verdünnung von 1:5000 hergestellt. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher sich in das Chromatin von Zellkernen einlagert. Er besitzt ein Absorptionsmaximum von 368 nm und emittiert Licht mit Wellenlängen von ca. 461 nm (blaue Fluoreszenz).
- **3 x 10 min in 0,1M PB in der Küvette wachen**
- Zum **Eindeckeln** wurden die Objektträger vorsichtig durch Abtupfen mit einem Papierhandtuch getrocknet, ca. ein Tropfen Fluorescent Mounting Medium auf einen Retinaschnitt gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt; eventuell vorhandene Luftblasen wurden durch vorsichtiges Drücken entfernt
- Die gefärbten Gefrierschnitte wurden im **Dunklen bei 4°C** aufbewahrt

### **2.3.2.2. Molekularbiologische Methoden**

#### **2.3.2.2.1. Ribonukleinsäure**

Bei der RNA (*ribonucleic acid*) handelt es sich um ein einzelsträngiges Molekül mit Ribose-Phosphat-Gerüst und vier unterschiedlichen Basen (Adenin, Guanin, Cytosin, Uracil), welche jeweils an ein Zuckermolekül binden. Zu den wichtigsten RNA-Arten gehören die sog. t-RNA (*transporter-RNA*), rRNA (*ribosomal-RNA*) und die mRNA (*messenger-RNA*). Im Rahmen der Transkription wird mit Hilfe der RNA-Polymerase die mRNA als einzelsträngige Kopie der (aktuell benötigten Gene der) DNA (*deoxyribonucleic acid*) angefertigt und trägt diese Information aus dem Zellkern ins endoplasmatische Retikulum zur rRNA. Die rRNA bildet die Ribosomen, die Orte der

Proteinsynthese. Im Rahmen der Translation wird die genetische Information von der mRNA abgelesen und mit Hilfe der tRNA zahlreiche Aminosäuren zur Herstellung der gewünschten Proteine aneinandergereiht.

Beim Arbeiten mit RNA ist grundsätzlich ihre außergewöhnliche Empfindlichkeit zu beachten. Die ubiquitär vorkommenden RNasen führen innerhalb kürzester Zeit zum Abbau der genetischen Information, deshalb sollte mit Geweben, aus welchen RNA gewonnen werden soll bzw. mit RNA selbst stets nur mit Handschuhen und unter möglichst sauberen Bedingungen umgegangen werden [151].

#### **2.3.2.2.1.1. RNA-Extraktion**

Zur RNA-Extraktion aus den einzelnen Retinae von P7, P11 und P21 wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Dieses eignet sich besonders für Gewebemengen von bis zu 30 mg und ist daher optimal für die ca. 10-20 mg schweren Rattennetzhäute. Die Retinae wurden zur Extraktion nicht gepoolt, sondern die RNA wurde aus jeder Netzhaut einzeln extrahiert und asserviert.

Zur Homogenisierung der einzelnen Retinae wurde der Gewebehomogenisator Precellys 24 von Peqlab benutzt. Die Retinae wurden dafür in entsprechende Gefäße (Precellys Ceramic Kit mit 1,4 mm Kügelchen) verbracht und mit RLT-Puffer bedeckt. Durch die Rotation und den Puffer findet ein Zellaufschluss statt, sodass die RNA danach freiliegt. Nach anschließender Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, in ein neues Tube überführt und die RNA durch Zugabe von 70% Ethanol ausgefällt. Die Mischung wurde dann auf ein RNeasy Mini Spin Column gegeben, während eines kurzen Zentrifugationschrittes band die RNA an die Membran der Säule. Die RNA wurde dann durch Zugabe von RW1 Puffer auf der Säule gewaschen und zum Entfernen genomischer DNA-Reste für 15 min mit einer DNase-Lösung (RNase free DNase, Qiagen) inkubiert. Danach erfolgte erneutes Waschen mit RW1- und RPE-Puffer und das Trocknen der auf der Säule befindlichen RNA durch einen 2 minütigen Zentrifugationsschritt. Zum Eluieren der RNA von der Säule wurde schließlich RNase freies H<sub>2</sub>O aus dem Kit auf die Säule gegeben und kurz zentrifugiert.

Mittels eines BioPhotometers wurde der jeweilige RNA-Gehalt bestimmt und die Probe bei -80°C eingefroren.

#### **2.3.2.2.1.2. RNA-Qualitätsnachweis**

Die Beurteilung der RNA-Qualität erfolgt über deren Integritätsnachweis mit Hilfe der Qiaxcel Gel-Elektrophorese von Qiagen. Dabei läuft die RNA in kleinen Gelkapillaren (Qiaxcel RNA Quality Control Cartridge) einen Stromgradienten entlang. So entsteht, genau wie bei der klassischen Elektrophorese, eine Auftrennung nach Fragmentgrößen. Zur Auswertung der Gelbilder wurde die Qiaxcel Screen Gel Software benutzt.

Da die rRNA prozentual den größten RNA-Anteil (ca. 70%) einer Zelle ausmacht, eignet sie sich hervorragend zur Überprüfung der Qualität. Sie besteht aus zwei Untereinheiten, der 18 S-Untereinheit aus ca. 1800 Nukleotiden und der 28 S-Untereinheit aus ca. 5000 Nukleotiden.

Zur technischen Durchführung wurde nach Herstellerangaben in ein 12-Tube-Strip jeweils 1 µl QX RNA Denaturierungspuffer vorgelegt, jeweils 1 µl RNA-Probe zugegeben und die Mischung dann für 2 min auf 70°C erhitzt und für 1 min auf Eis gestellt, um den Denaturierungsprozess einzuleiten. Die Strips wurden im Anschluss mit jeweils 8 µl Verdünnungspuffer aufgefüllt, in das letzte Tube wurde ein RNA Größenmarker von 200-6000 Nukleotiden (RNA Size Marker 200-6000 nt, Qiagen) gegeben. Danach konnte der Prozess gestartet werden.

Während der Analyse laufen die beiden RNA-Komplexe mithilfe von Strom je nach Größe unterschiedlich schnell durch das Gelbett der Kapillare und formen so zwei mehr oder weniger dicke Banden. Die Dicke der Bande gibt dabei Aufschluss über die Quantität der RNA, während sich die Qualität der Proben durch eindeutig abgrenzbare Banden auszeichnet. Stark degradierte RNA-Proben ergeben daher keine deutlichen Banden, sondern eine mehr oder weniger einheitliche Verteilung der RNA auf die komplette Gelstrecke.

### 2.3.2.2.1.3. Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription (RT) handelt es sich um ein Verfahren zur Umschreibung von RNA in cDNA (*complementary DNA*). Dabei synthetisiert ein Enzym, die reverse Transkriptase oder auch RNA-abhängige DNA-Polymerase, einen komplementären DNA-Strang zum vorliegenden RNA-Einzelstrang. Die cDNA ist stabiler als die RNA, so kann sie im nächsten Schritt mittels quantitativer PCR amplifiziert und Genregulationen bestimmt werden [151].

Um verlässliche und qualitativ hochwertige PCR-Ergebnisse zu erzielen, wurden die Vorbereitungen für die PCR nach den MIQE-Guidelines (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) durchgeführt [152]. Demnach wurden pro RNA jeweils drei cDNAs umgeschrieben.

Für die reverse Transkription wurde das PrimeScript cDNA Synthesis Kit von Takara benutzt. Das Protokoll wurde nach Herstellerangaben ausgeführt:

Zur Herstellung des RNA-Template Mixes wurden in der vorliegenden Arbeit jeweils 800 ng RNA eingesetzt:

2 µl Random 6mers (Primer, 50µM)

1 µl dNTP Mixture (10mM)

x µl RNA Template (je nach Konzentration; es sind 800 ng einzusetzen)

mit dH<sub>2</sub>O ad 10 µl

➔ 5 min bei 65°C inkubieren, danach sofort auf Eis abkühlen

Danach wurde der Master Mix für die reverse Transkription angesetzt:

10 µl Template Mix (siehe oben)

4 µl 5x Buffer

0,5 µl (20 units) RNase Inhibitor (40U/µl)

1 µl (200 units) PrimeScript Rtase (200U/µl)

mit 4,5 µl dH<sub>2</sub>O ad 20 µl

Reaktionsbedingungen für reverse Transkription mit Random – Primern:

10 min bei 30°C

60 min bei 42°C

15 min bei 70°C

### 2.3.2.2.2. Quantitative PCR

Um verlässliche und qualitativ hochwertige PCR-Ergebnisse zu erzielen, wurden die Vorbereitungen für die PCR nach den MIQE-Guidelines (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) durchgeführt [152].

Das Prinzip der PCR (*polymerase chain reaction*) beruht auf der Amplifikation eines bestimmten Gens (oder eines Abschnitts davon). Durch eine hohe Anfangstemperatur von >90°C lösen sich die beiden Doppelstränge der DNA voneinander (*denaturation*) und ermöglichen so den Primern das Anlagern an die Einzelstränge (*annealing*). Durch exaktes Primerdesign kann so genau bestimmt werden, welches Gen oder welcher Abschnitt der DNA vervielfältigt werden soll. Nach dem Binden der Primer an die DNA beginnt die DNA-Polymerase mit der Synthese jeweils eines Komplementärstrang zum vorliegenden Einzelstrang (*elongation*). Bei ca. 40 solcher Zyklen kommt so eine DNA-Menge zustande, die problemlos nachgewiesen werden kann.

Die Besonderheit der quantitativen oder *real time* PCR liegt in der direkten Messbarkeit der Menge an DNA-Amplifikaten, während bei der klassischen PCR mehr nur eine Aussage über das (Nicht-) Vorhandensein einer bestimmten Sequenz getroffen werden kann. Dies ist durch die Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes möglich, welcher sich ausschließlich in doppelsträngige (also neu amplifizierte DNA) einlagert. Wird ein definiertes Fluoreszenz-Hintergrundrauschen überschritten, so kann das Signal als CT-Wert (*cycle threshold*) vom Gerät gemessen und als Beginn der danach exponentiell ansteigenden Fluoreszenzkurve angegeben werden [151]. Eine Schmelzkurvenanalyse (nach abgelaufener PCR) gibt durch schrittweise Temperaturerhöhung und damit Denaturierung und Fluoreszenzabnahme bei einer bestimmten Temperatur Aufschluss über die Spezifität der einzelnen, entstandenen Produkte [153].

Es wurde jeweils ein PCR-Lauf mit allen Proben einer Versuchsrunde und einem Primerpaar durchgeführt. Dies bedeutete bei 24 Augen **pro Versuchsrunde** (drei Untersuchungszeitpunkte P7, P11, P21 mit jeweils acht Augen A-L, A-R, B-L, B-R, C-L, C-R, D-L, D-R; die beiden Augen der Gruppen B und D wurden hier aus Gründen der Rückverfolgbarkeit nicht gepoolt) und drei cDNAs pro Auge/RNA: 72 Proben pro Gen. Pro Gen wurden jeweils zwei PCR Durchläufe gemacht und die jeweiligen CT-Werte gemittelt. Bei sechs Genen (HIF1 $\alpha$ , VEGF-A, EpoR, TNF $\alpha$ , Nos2, HPRT) mit je zwei PCR-Läufen kommt man auf **12 PCR-Läufe mit 72 Proben pro Versuchsrunde bei insgesamt fünf Versuchsrunden**. Dies ergibt pro Gen und untersuchte Gruppe (z.B. A-L) zehn gemittelte CT-Werte (jeweils drei cDNAs  $\rightarrow$  Mittelwert  $\rightarrow$  zwei PCR – Läufe pro Versuchsrunde  $\rightarrow$  Mittelwert  $\rightarrow$  fünf Versuchsrunden  $\rightarrow$  Mittelwert = End-CT-Wert).

Nach dem Ende der PCR wurden die Produkte noch auf ein Agarosegel aufgetragen, um die Produktgröße zu überprüfen.

### 2.3.2.2.1. PCR-Protokoll

Die quantitativen PCR Untersuchungen wurden auf dem Cycler „Quantitative PCR-Realplex 4“ von Eppendorf durchgeführt, zur Darstellung wurde die Realplex Software benutzt.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Dauer [Minuten]
Hot Start	98	00:10
Annealing	66,9	00:10
VEGF-A	65,5	
HIF1 $\alpha$	67,8	
Epo-R	65,5	
TNF $\alpha$	61,8	
NOS-2	53,2	
HPRT	53,2	40x
Extension	72	00:30
Denaturierung	98	00:10
Annealing	s.o.	00:15
Extension	72	05:00
	95	00:15
	60	00:15
Schmelzkurvenanalyse	Schrittweise Erhöhung um 0,4°C/s	
	95	00:15

Tabelle 20: Reaktionsbedingungen für quantitative PCR

Die quantitative PCR wurde in PCR TW Tubes 0.2 ml (High Profile, Flat Optical Cap von Biozym) mit einem Probenansatz von jeweils 10  $\mu$ l und 500 ng cDNA durchgeführt.

Als Polymerase wurde die Prime Star HS DNA Polymerase sowie die passenden Puffer und dNTPs von Takara verwendet. Als interkalierender Fluoreszenzfarbstoff diente LC Green Plus+.

Komponente	Menge [ $\mu$ l]
Puffer (5x Prime Star Buffer, Mg <sup>2+</sup> 5mM)	1,9
dNTP (dNTP Mixture, 2.5 mM)	2
Primer a (10 pmol/ $\mu$ l)	0,2
Primer b (10 pmol/ $\mu$ l)	0,2
Polymerase (Prime Star HS DNA Polymerase (2.5 U/ $\mu$ l)	0,1
LC Green Plus (1x)	0,8
cDNA	x $\mu$ l (je nach Konzentration; es sind 500 ng einzusetzen)
dH <sub>2</sub> O	ad 10 $\mu$ l

Tabelle 21: Mastermix für einen 10 $\mu$ l Probenansatz (n = 1)

### 2.3.2.2.2. Berechnung des *fold change* mittels $\Delta\Delta$ CT-Methode

In der vorliegenden Arbeit wurde eine relative Quantifizierung der Genprodukte vorgenommen, d. h. die Hoch- oder Herunterregulation eines Gens wird anhand einer Kontrollgruppe und eines Kontrollgens (*housekeeping gene*) berechnet, welches in allen Zellen immer in etwa der gleichen Menge exprimiert wird. Dafür wurde die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) gewählt, da diese speziell auch unter (zyklischer) Hyperoxie konstant exprimiert wird [154].

Die relative Quantifizierung wurde durch Berechnung des *fold change* (FC) mittels der wissenschaftlich anerkannten  $\Delta\Delta$ CT-Methode durchgeführt [153] [155]. Der FC gibt dabei schlussendlich die n-fache Hoch- bzw. Herunterregulation eines Gens an. Werte über 1 entsprechen (unter Beachtung der logarithmischen Einheit des FC) einer Heraufregulation, Werte unter 1 einer Herabregulation. Der Wert 1 dient als sog. *baseline* oder Nulllinie, diese wird aus der Expression des *housekeeping genes* und der Genexpression der Kontrollgruppe errechnet.

Die entsprechenden Formeln lauten:

$$\Delta CT = CT \text{ Zielgen} - CT \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ Intervention} - \Delta CT \text{ Kontrolle}$$

$$FC = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Für die Berechnung des FC-Werts von z.B. VEGF-A einer Interventionsgruppe (z.B. A-L) in einer Versuchsrunde gilt somit Folgendes:

- Zuerst muss  $\Delta CT$  sowohl für A-L (Intervention) als auch für D (Kontrolle) berechnet werden, d.h.:

- $\Delta CT$  A-L:

CT VEGF-A (Zielgen) = Mittelwert aus zwei PCR-Läufen mit jeweils drei cDNAs für A-L

CT HPRT (Referenzgen) = Mittelwert aus zwei PCR-Läufen mit jeweils drei cDNAs für A-L

$$\Delta CT \text{ A-L} = CT \text{ VEGF} - CT \text{ HPRT}$$

- $\Delta CT$  D:

CT VEGF-A (Zielgen) = Mittelwert aus zwei PCR-Läufen mit jeweils sechs cDNAs für D (keine Seitenunterscheidung zwischen Augen)

CT HPRT (Referenzgen) = Mittelwert aus zwei PCR-Läufen mit jeweils sechs cDNAs für D (keine Seitenunterscheidung zwischen Augen)

$$\Delta CT \text{ D} = CT \text{ VEGF} - CT \text{ HPRT}$$

$$\rightarrow \Delta\Delta CT \text{ VEGF} = \Delta CT \text{ A-L} - \Delta CT \text{ D}$$

$$\rightarrow FC \text{ VEGF-A für A-L} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

- Schließlich wurde aus den FC-Werten jeder Interventionsgruppe der einzelnen Runden der Mittelwert gebildet, dieser gab somit den endgültigen FC-Wert für jede Gruppe an.

### **2.3.3. Statistik**

Zur statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse wurde das Programm Sigma Plot verwendet.

#### **2.3.3.1. Immunhistochemie**

Im Rahmen der Analysen von Plexusausbreitung, GD, PGB/GD und BP wurden mittels eines statistischen, zweiseitigen t-Tests signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Interventionsgruppen, innerhalb der Interventionsgruppen zwischen verschiedenen Untersuchungstagen und auch zwischen Interventionsgruppen und Kontrollgruppe berechnet. Bei p-Werten von  $<0,05$  (d. h. einer Übereinstimmung der zu vergleichenden Werte von  $<5\%$ ) bestand zwischen den beiden untersuchten Gruppen ein signifikanter Unterschied. Vor der Durchführung des t-Tests wurde zuerst die Normalverteilung der Daten aus den einzelnen Versuchen überprüft.

#### **2.3.3.2. Molekularbiologie**

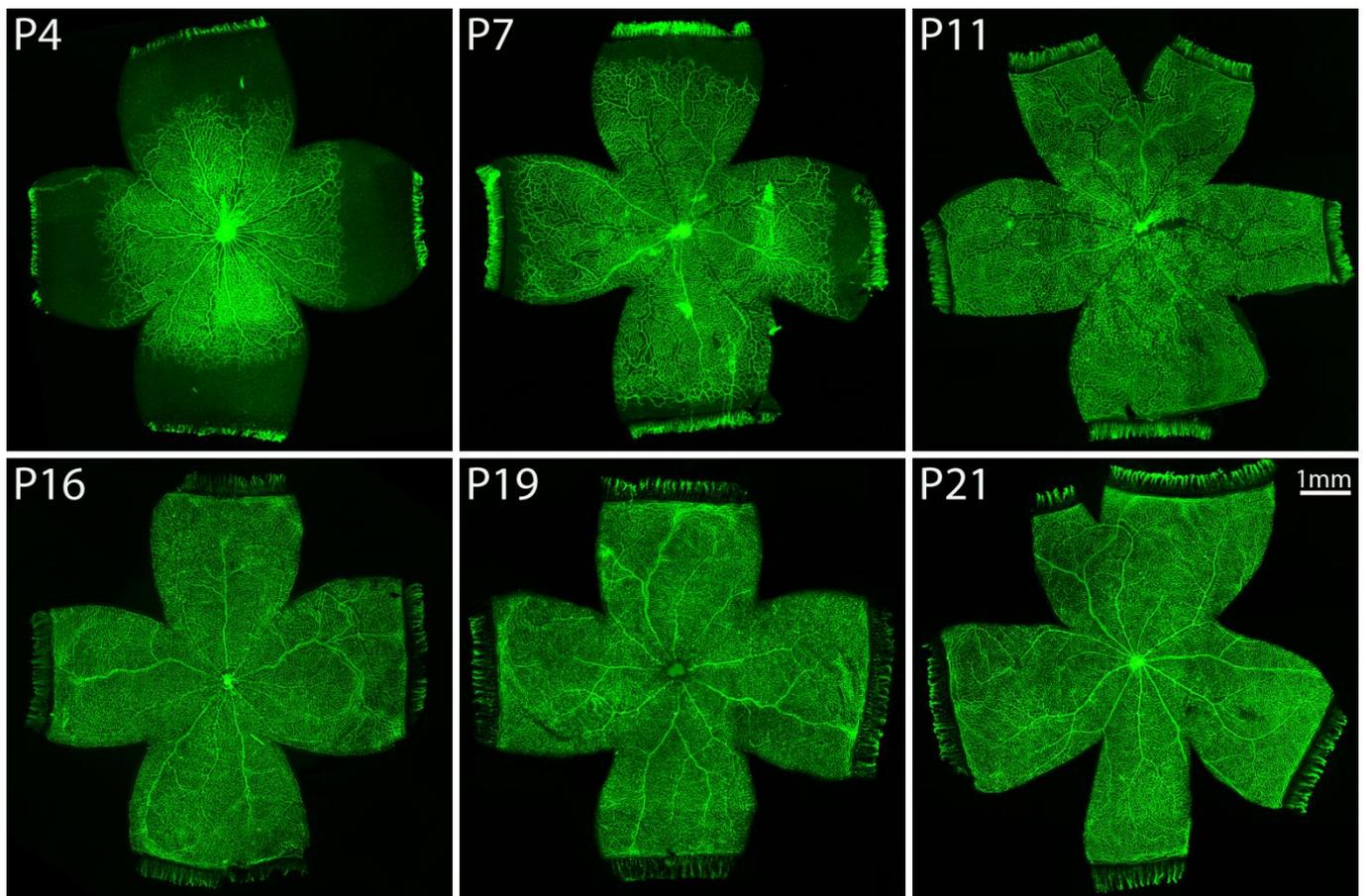
Bezüglich der Genexpression wurden statistische signifikante Unterschiede innerhalb der Interventionsgruppen an unterschiedlichen Untersuchungstagen berechnet. Nach der Überprüfung der Normalverteilung wurden mittels eines Einweg-ANOVA-Tests jeweils drei verschiedene Werte (P7, P11, P21) verglichen und signifikante Unterschiede berechnet.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Morphologische Analyse

#### 3.1.1. Vaskularisierungsverlauf der Rattenretina auf *flatmount*-Präparaten

Wie in 1.2.1. erklärt, findet die Vaskularisierung der Nagerretina im Gegensatz zum Menschen erst *post natum* statt. An P1 oder auch schon in späten Gestationsstadien [19] beginnend, wächst die oberflächliche Gefäßschicht von zentral nach peripher hin aus und hat an P4 bei der Ratte ca. die halbe Wegstrecke zwischen Zentrum und *Ora serrata* vaskularisiert. Auf den angefertigten *flatmount*-Präparaten gesunder Rattenretinae (Abbildung 32) lässt sich erkennen, dass auch an P7 der superfizielle Plexus die retinale Peripherie noch nicht erreicht hat, sondern erst an P10 nahezu die komplette Netzhaut bedeckt. Zwischen P10 und P21 verdichtet sich das vaskuläre Netzwerk immer mehr. Von der oberflächlichen Gefäßschicht wachsen vaskuläre Sprouts vertikal in die äußere plexiforme Schicht aus, um dort den tiefen Plexus zu bilden. Dieser Vorgang lässt sich auf *flatmounts* jedoch nur schwer darstellen und zeigt sich auf der Abbildung lediglich als immer dichter und engmaschiger werdendes Gefäßsystem. Nach dem vertikalen Sprouting anastomosieren die Sprouts in der äußeren plexiformen Schicht in horizontaler Ebene. Während und auch nach dieser Plexusformation finden außerdem Differenzierungs- und Reifungsvorgänge statt, die unter anderem zur Ausbildung reifer Arterien und Venen führen. Im Zuge dessen bilden sich außerdem im oberflächlichen Plexus die PGB, sie sind auf den *flatmounts* nur während einer bestimmten Wachstumsphase zu erkennen. Vor P7 steht aufgrund noch unvollständiger Gefäßreifung des oberflächlichen Plexus die Bildung der PGB noch aus. Nach ihrer Ausbildung sind sie jedoch nur bis ca. P11 auf dem *flatmount* erkennbar, da sie dann von der tieferen Gefäßschicht unterwachsen werden. Sie sind danach zwar noch vorhanden, auf dem retinalen *flatmount* jedoch nicht mehr sichtbar. Das retinale Gefäßnetzwerk ist ca. an P25 fertig ausgebildet.



**Abbildung 32: Vaskularisierungsverlauf der gesunden Rattennetzhaut**  
 Lebensstage P4 bis P21; grün: Isolectin B4

### 3.1.2. Fluoreszenz - Angiographie

Die angiographischen Untersuchungen werden bei pigmentierten Long Evans Ratten aller Gruppen an P11 und P21 durchgeführt (Abbildungen 33 und 34).

Dabei stellt sich der Augenhintergrund nach Injektion des Fluoreszeins leicht grünlich bzw. bei älteren Tieren dann schwarz dar, während die Gefäße grün fluoreszieren.

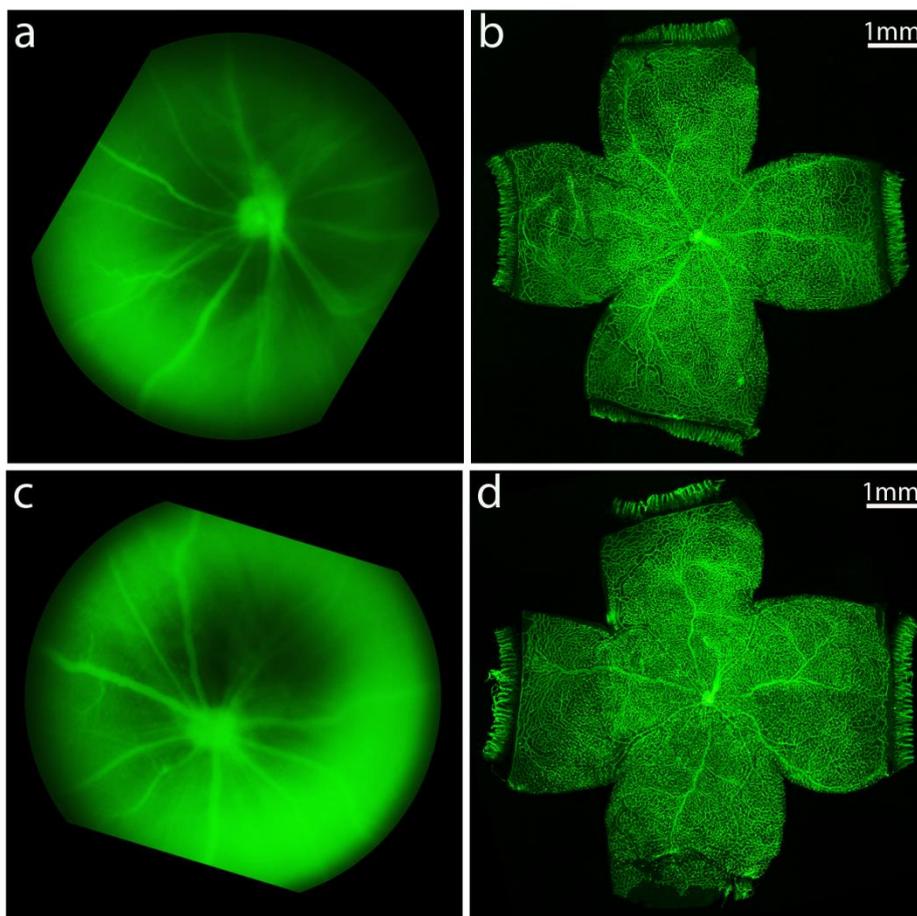
Die an P11 aufgenommenen Bilder zeigen die großen Netzhautgefäße lediglich als verwaschene, grüne Strukturen, die straßenartig radiär vom Sehnerv aus in die Peripherie strahlen. Auch durch Ändern der Fokuseinstellungen lassen sich diese Strukturen nicht scharfstellen und nur ungenau nachverfolgen. Details wie Gefäßabgänge oder kleinere Kapillaren sind auf dem grünlich schimmernden Augenhintergrund nicht zu erkennen. Die Gefäße sind lediglich im zentraleren Netzhautbereich auszumachen, weiter in der Peripherie verblasst das ohnehin schwache Signal immer mehr, sodass hier keine Aussage über den *in vivo* Zustand

der peripheren Netzhautgefäße an P11 getroffen werden kann. Bei weiterem Verstellen des Fokus lassen sich die parallel bis netzartig verlaufenden Aderhautgefäße ebenfalls unscharf im Augenhintergrund darstellen.

Die beschriebenen Fluoreszenz-Angiographie (FA)-Bilder sind von mangelhafter Qualität und lassen nur ungefähre Schlüsse über den Verlauf der großen Netz- und Aderhautgefäße im zentralen/posterioren Augenteil an P11 zu, eine Aussage über das Wachstum der kleineren retinalen Gefäße oder eventuell vorhandene Gefäßpathologien ist nicht möglich. Die *in vivo* Beurteilung des retinalen Gefäßsystems von 11 Tage alten Ratten mittels FA ist demnach keine aussagekräftige und verlässliche Methode. Seitenunterschiede zwischen den Augen operierter Tiere, grundsätzliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen oder die Ausdehnung des oberflächlichen Gefäßplexus sind an P11 mittels dieser Methode nicht auszumachen. Auf Abbildung 33 sind zur Veranschaulichung die Gefäßsysteme zweier Netzhäute an P11 jeweils mittels Angiographie-Aufnahme sowie mittels *flatmount*-Präparat dargestellt. Die auf dem *flatmount* gut sichtbaren großen Arterien und Venen lassen sich in ihrem Verlauf auf den Angiographie-Bildern zwar wiederfinden, dienen jedoch auf keinen Fall zu detaillierteren Untersuchungen.

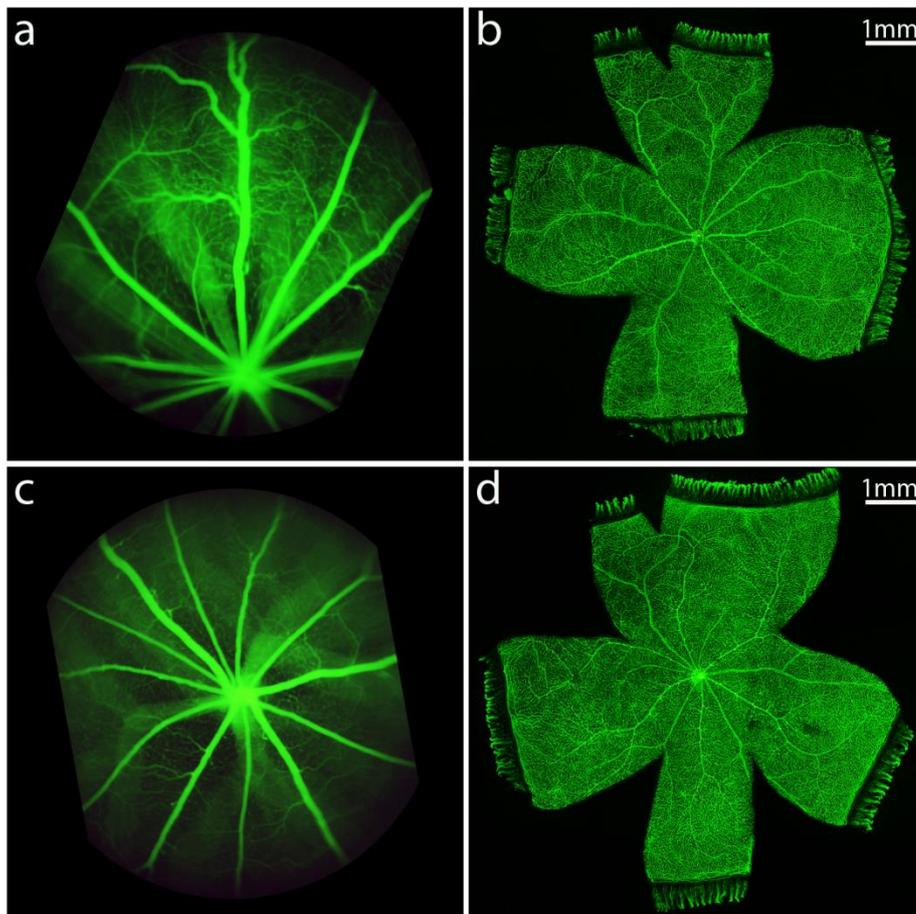
Die an P21 untersuchten Netzhäute lassen sich besser beurteilen (Abbildung 34). Der Augenhintergrund stellt sich während der angiographischen Untersuchung zu diesem Lebenszeitpunkt schwarz dar, was die Beurteilung der grün fluoreszierenden Gefäße erleichtert. Die radiär vom Sehnerv ausstrahlenden großen Netzhautgefäße lassen sich im posterioren/zentralen Augenteil scharf abbilden und in ihrem Verlauf gut nachverfolgen. Auch das feine Kapillarbett, kleinere Gefäßabzweigungen und der Austritt der großen Arterien und Venen aus dem Sehnervenkopf lassen sich bei der richtigen Fokuseinstellung und Fluoreszeinperfusion differenzieren, wenn auch nur in insgesamt kleiner Vergrößerung. Bei der Unterscheidung von großen Venen und großen Arterien kann sowohl im *flatmount* als auch im Angiographie-Bild der oft größere Venendurchmesser helfen. In der FA kommt eine stärkere Fluoreszenzfärbung der Venen, bedingt durch ihre dünnere Gefäßwand hinzu. Bei ausreichender Mydriasis lassen sich die Gefäße an P21 weiter in die retinale Peripherie verfolgen als an P11.

Die großen Netzhautgefäße von 21 Tage alten Ratten können bei sachgemäßer Anwendung der Methoden verlässlich detektiert und beurteilt werden, die feineren Strukturen und gerade das Kapillarnetz sind jedoch schwieriger darzustellen. Auch bei erfahrenen Untersuchern und optimalem Handling von Versuchstieren und Equipment ist das angiographische Bild dieser Strukturen nicht immer scharf und zufriedenstellend und kann in manchen Fällen gar nicht erzeugt werden. Auch die Darstellung und Beurteilung der retinalen Peripherie mittels FA gestaltet sich in der Gänze oft schwierig und ist nicht immer möglich. Die angiographische Untersuchung der Netzhautgefäße aus den verschiedenen Gruppen an P21 ergibt dabei augenscheinlich weder spezielle Besonderheiten oder Pathologien im Gefäßwachstum, noch können Unterschiede zwischen den Gruppen entdeckt werden, da hierfür die Vergrößerung zu gering ist.



**Abbildung 33: Korrelation Angiographie - flatmount, P11**

**(a),(c)** *In vivo* FA **(b),(d)** *post mortem flatmount*-Präparate; die Bilder **(a)** und **(b)** sowie **(c)** und **(d)** stammen jeweils vom gleichen Tier - der Verlauf der großen Gefäße entspricht sich in beiden Darstellungsweisen; grün: Fluoreszein (**(a)** und **(c)**) bzw. Isolectin B4 (**(b)** und **(d)**)



**Abbildung 34: Korrelation Angiographie - flatmount, P21**

**(a),(c)** *In vivo* FA **(b),(d)** *post mortem* flatmount-Präparate; die Bilder **(a)** und **(b)** sowie **(c)** und **(d)** stammen jeweils vom gleichen Tier - der Verlauf der großen Gefäße entspricht sich in beiden Darstellungsweisen; grün: Fluoreszein **(a)** und **(c)** bzw. Isolectin B4 **(b)** und **(d)**

Abschließend ist festzuhalten, dass für eine detaillierte Beurteilung eventuell vorhandener, weniger augenscheinlicherer Veränderungen die Vergrößerung der Funduskamera nicht ausreicht. Diese Art von Pathologien muss anhand von *post mortem* Methoden mittels *flatmount*-Präparation und Fluoreszenzmikroskop erfolgen (siehe 3.1.4.).

Die Abbildungen zeigen außerdem deutlich, dass die *in vivo* FA bezüglich der Beurteilung des retinalen Vaskularisierungsverlaufs im Vergleich zum *flatmount* keine zusätzlichen oder hilfreichen Informationen liefert. Besonders an P11 verfügt die FA über nur wenig Aussagekraft und kann, selbst bei besserer Qualität der Aufnahmen an P21, die Anfertigung von flatmount-Präparaten nicht ersetzen.

Eine Besonderheit zeigt sich jedoch im linken Auge (operierte Seite) eines 21 Tage alten Tieres aus der Gruppe A (Hypoxie/Ischämie). In Abbildung 35 sind

Angiographie-Aufnahmen dieser Netzhaut neben das entsprechende *flatmount*-Präparat gestellt. Während der *in vivo* FA lassen sich auf der superioren Netzhaut kleine, multifokale und lokal begrenzte Fluoreszeinsammlungen außerhalb der Gefäße detektieren (Abbildung 35 (b)). Dabei könnte es sich um Gefäßextravasationen handeln, die durch die Hypoxie- bzw. Ischämie-bedingte Schädigung der Gefäßwände zustande kommen. Die nähere Charakterisierung der Extravasationen gelingt mittels FA nicht, grundsätzlich wäre der Austritt von Blutplasma mit oder ohne roten Blutkörperchen möglich. Bei einer Korrelation dieses Bereichs mit dem entsprechenden *post mortem* Präparat zeigt sich, dass die *in vivo* sichtbaren Blutungen auf dem *flatmount* nicht zu detektieren sind (roter Ring in Abbildung 35 (a) und (b)).

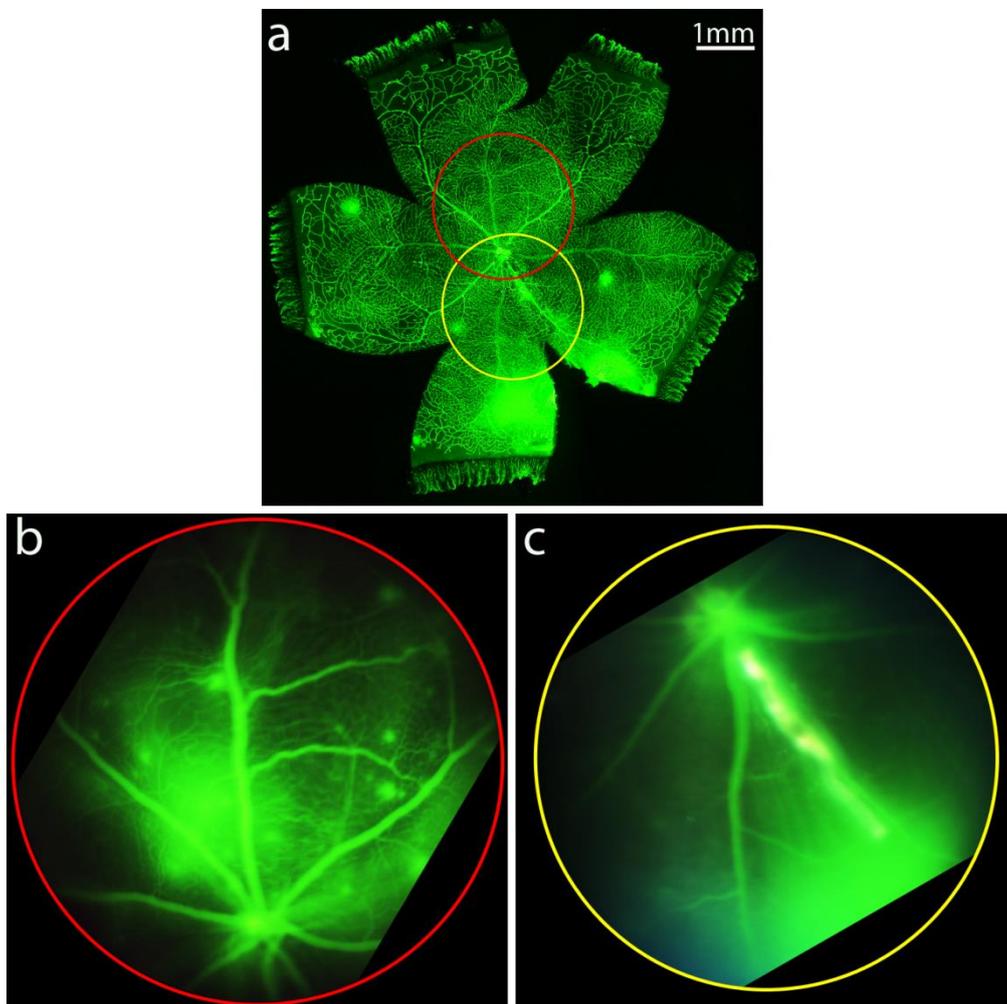
Aufnahmen vom inferioren Teil dieser Netzhaut existieren nur in schlechter Qualität (Abbildung 35 (c)). Auf diesen lässt sich eine massiv große Ansammlung von Flüssigkeit im untersten Teil der Netzhaut erkennen, welche sich als unscharf begrenzte Akkumulation von grünem Fluoreszenzfarbstoff darstellt. Ein weiterer Austritt von Fluoreszein ist entlang eines posterior liegenden Gefäßes auf dem Angiographie-Bild zu sehen. Es handelt sich dabei um einen solch starken Austritt von Farbstoff, dass sich dieser Bereich in der Angiographie nicht mehr nur grün, sondern weiß überstrahlt darstellt. Das Pendant dazu auf dem retinalen *flatmount* ist eine ebenfalls starke Grünfärbung in den besagten Bereichen (gelber Ring in Abbildung 35 (a) und (c)).

Die Korrelation solcher Extravasationen auf Angiographie-Aufnahmen und den entsprechenden *flatmounts* ist ebenso schwierig wie ihre Charakterisierung. Fluoreszein bindet zu 80% an Blutplasmabestandteile [146]. Das Vorhandensein von extravasalen Fluoreszeinsammlungen kann also sowohl für eine Blutung (gleichzeitiger Austritt von Erythrozyten) als auch den Austritt von Blutplasma oder ein Ödem sprechen.

Genauso können auch extravasale Isolectin Ansammlungen auf (den entsprechenden) *flatmount*-Präparaten nicht 100%ig identifiziert werden, da Isolectin B4 neben Endothelzellen auch an Erythrozyten und Entzündungszellen bindet [148] und gelegentlich auch Färbeartefakte verursacht. Aus diesem Grund sind stets zwei technische Methoden zum Nachweis retinaler Blutungen erforderlich. Extravasale Isolectin Ansammlungen können so z.B. auf *flatmount*-Präparaten in beiden Augen der Gruppen A und C an P11 und P21 nachgewiesen werden. Als Bestätigung für

das Vorhandensein einer Blutung kann hier jedoch die makroskopische Sichtbarkeit dieser auf der nativen (frisch präparierten) Netzhaut dienen (siehe auch 3.1.4.5.6.), sodass hier kein Zweifel an der Zusammensetzung des Exsudats besteht.

Offensichtlich wird die Darstellbarkeit retinaler Blutungen auf *flatmounts* durch ihre Größe bestimmt. Kleinere Blutungen lassen sich stets mittels *in vivo* FA nachweisen, können jedoch nach dem Tod des Tieres auf dem retinalen Flachpräparat nicht mehr detektiert werden. Anders ist die Situation bei großflächigen, retinalen Hämatomen oder *vascular leakage* Arealen. Sie sind sowohl mittels der FA als auch auf dem *flatmount* mithilfe einer Isolectin B4 Färbung darzustellen.



**Abbildung 35: Korrelierende Darstellung retinaler Extravasationen**

21-Tage alte Rattennetzhaut aus Gruppe A (linkes Auge) (a) *post mortem flatmount* Präparat; Isolectin B4 gefärbt (b),(c) *in vivo* FA-Aufnahmen; alle Bilder stammen vom selben Tier (Erklärung siehe Text)

Zusammenfassend kann die FA zwar genutzt werden, um sich einen Überblick über die Netzhautgefäße am lebenden Tier (z.B. Exsudationen) zu verschaffen und auch wichtige Informationen über die retinale Gefäß- und Sauerstoffversorgung *in vivo* liefern, detaillierte Gefäßanalysen müssen jedoch trotzdem auf *flatmounts* vorgenommen werden.

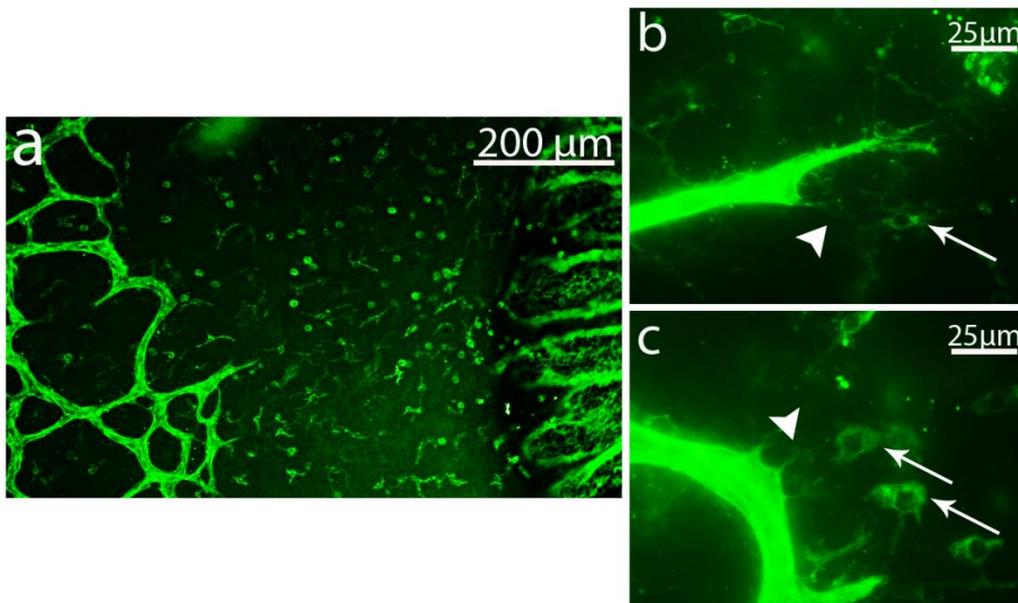
### **3.1.3. Beschreibung des retinalen Gefäßsystems an P11 und P21 auf *flatmount* - Präparaten**

Der nun folgende Abschnitt soll beispielhaft eine Übersicht über die Morphologie der Versuchsnetzhäute geben. Hierfür sind in Abbildung 37 die Retinae aller Versuchsgruppen an P11 und in Abbildung 38 an P21 dargestellt. Die Retinae wurden hierfür wie beschrieben präpariert und gefärbt. Durch das viermalige Einschneiden und anschließend flache Eindeckeln der Netzhaut entsteht die typische Kleeblattform, welche durch den dorsalen Einschnitt, der zur Richtungsorientierung auf der Retina dient, vervollständigt wird. Die grüne Färbung der Gefäße und der (als äußere Begrenzung fungierenden) *Ora serrata* entsteht durch den an das Isolectin gekoppelten, fluoreszierenden Sekundärantikörper.

Die Netzhäute auf den beiden Abbildungen sind randomisiert ausgewählt und sollen beispielhaft die Morphologie der jeweiligen Gruppe repräsentieren. Die Beschreibung des retinalen Gefäßsystems in einer kleinen Vergrößerung (x8) verschafft hier einen ersten Überblick über die gesamte Netzhaut und stellt allgemeine Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten zwischen den Gruppen dar.

An P11 weisen die Netzhäute einen nahezu vollständig ausgebildeten, oberflächlichen Gefäßplexus auf, welcher von zentral nach peripher auswächst und die Retina mit einem gleichmäßigen Gefäßnetzwerk bedeckt. Die oberflächliche Schicht hat dabei an P11 in allen Gruppen in etwa denselben Weg zurückgelegt, es lassen sich nur minimale Unterschiede erkennen, welche der Individualität der Tiere zuzuschreiben sind und sich bei Bildung eines Gruppenmittelwerts neutralisieren. Auffällig ist die leichte Verzögerung des Plexuswachstums nach inferior, welche in allen Gruppen zu beobachten ist (Abbildung 37).

In solchen, noch nicht vollständig vaskularisierten Bereichen lässt sich außerdem die Beteiligung der retinalen Mikroglia an der Angiogenese beobachten. In Abbildung 36 erkennt man deutlich, wie sich Filopodien der Tip-Zelle an der Mikroglia -Zelle (bzw. ihrer VEGF-Ausschüttung) orientieren.



**Abbildung 36: Beteiligung von Mikroglia an der Angiogenese**

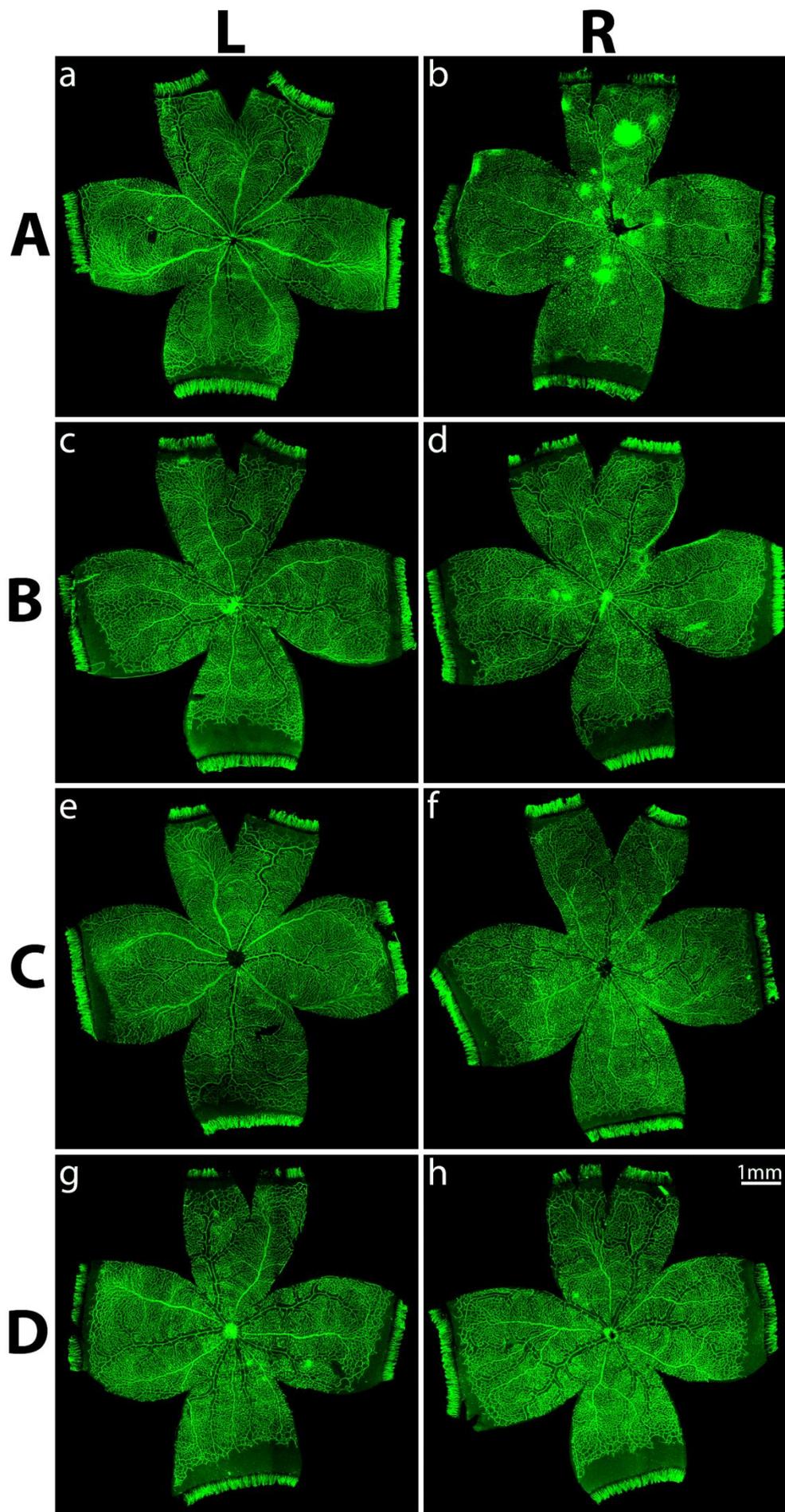
**(a)** Vaskuläre Front (P11) kurz vor Erreichen der Ora serrata (rechts); im noch avaskulären Bereich sind zahlreiche Mikroglia-Zellen angefärbt **(b) (c)** Filopodien der Tip-Zellen (Pfeilspitzen) orientieren sich an den Mikroglia-Zellen (Pfeile); grün: Isolectin B4

Der tiefe Gefäßplexus ist an P11 ebenfalls schon in Teilen vorhanden. Seine Ausdehnung schwankt zwischen den Gruppen und lässt sich in dieser Vergrößerung nur erahnen. Deshalb wird in 3.1.4.1. eine detaillierte quantitative Analyse der Entwicklung der tiefen Gefäßschicht vorgenommen.

Das Kapillarnetzwerk verteilt sich bei allen Gruppen gleichmäßig über die Netzhaut und zeigt in dieser Vergrößerung keine Auffälligkeiten oder Unregelmäßigkeiten. Die großen retinalen Gefäße des oberflächlichen Plexus haben sich bereits gebildet und zu Arterien und Venen differenziert. In abwechselnder Reihenfolge sind auf der Netzhaut im Schnitt jeweils fünf große Arterien und fünf große Venen vorhanden. Eine Unterscheidung der beiden Gefäßarten kann unter anderem anhand der Isolectin-Färbung vorgenommen werden. An P11 erscheinen die großen Venen in der Isolectin-Färbung sehr viel heller bzw. stärker gefärbt als die Arterien. Die

Arterien sind außerdem durch die kapillarfreien Gebiete (PGB) in ihrer direkten Nachbarschaft zu erkennen. Diese PGB werden in 3.1.4.3. bezüglich ihrer Breite analysiert. Die großen Gefäße spalten sich in der retinalen Peripherie in kleinere Gefäße auf, bis es sich nur noch um Kapillaren handelt, die dann wiederum miteinander verschmelzen.

Zu erwähnen ist noch die massive Isolectin-Ansammlung in A-R, bei der es sich um eine extravasale Flüssigkeitsansammlung handelt. Diese lokale Gefäßpathologie wird in verschiedenen Versuchsaugen gefunden und in 3.1.4.5.6. genauer beschrieben.



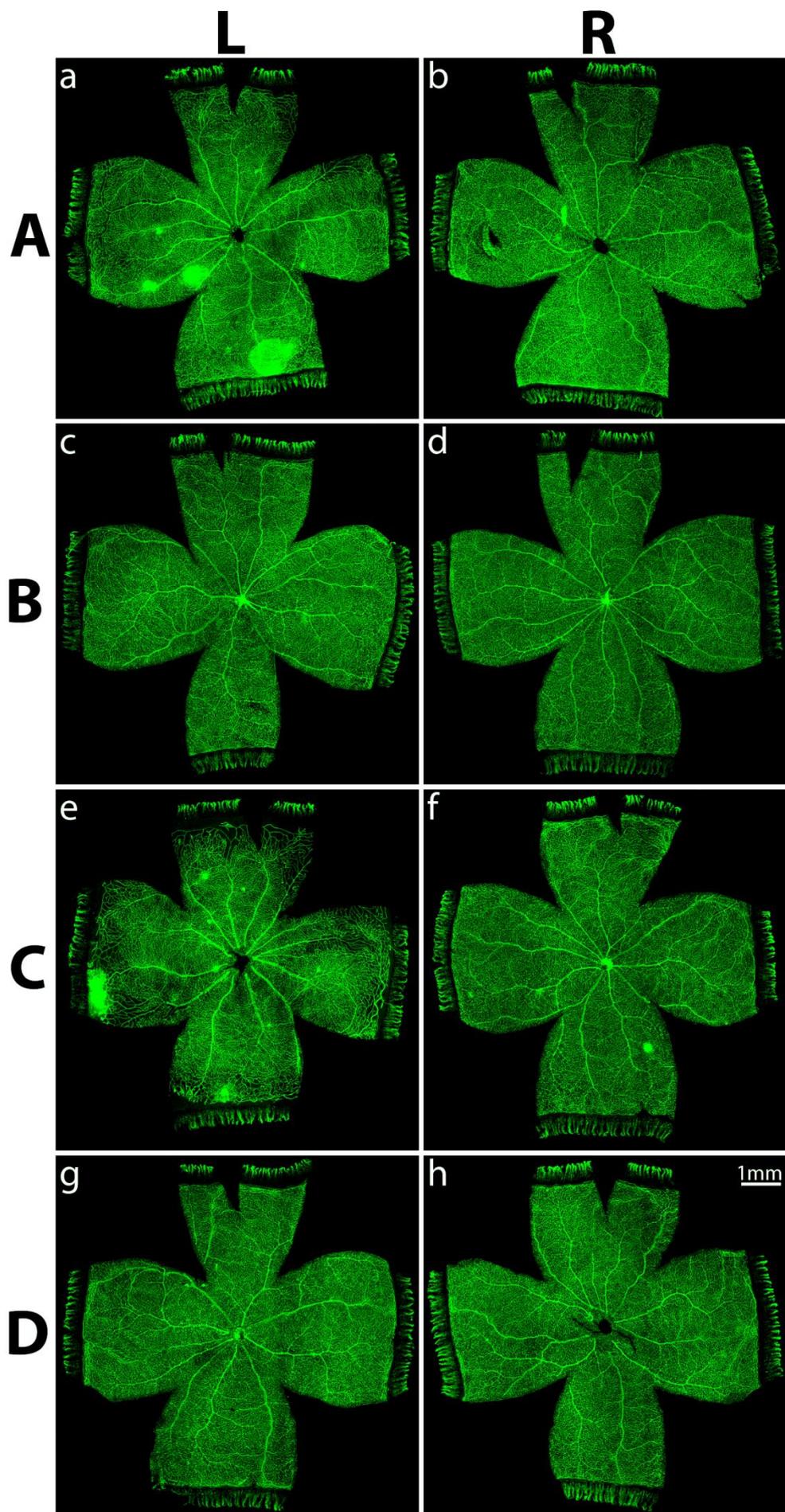
**Abbildung 37: Beispielhafte Darstellung der Versuchsnetzhäute an P11**  
 Versuchsgruppen A-D (a), (c), (e), (g) linkes Auge; (b), (d), (f), (h) rechtes Auge;  
 grün: Isolectin B4

Die in Abbildung 38 dargestellten, 21 Tage alten Netzhäute weisen ebenfalls in den Übersichtsaufnahmen kaum Unterschiede zwischen einander auf. Das retinale Gefäßsystem ist zu diesem Zeitpunkt in allen Gruppen nahezu vollständig ausgebildet. Der oberflächliche sowie der tiefe Gefäßplexus bedecken in einem engmaschigen und gut differenzierten Netzwerk aus Kapillaren, Arterien und Venen die gesamte Netzhaut. Durch das Auswachsen der tiefen Gefäßschicht sind die oben erwähnten PGB nicht mehr sichtbar und somit zur Identifizierung großer Arterien an P21 nicht mehr heranzuziehen. Die Unterscheidung zwischen den beiden großen Gefäßtypen kann hier jedoch über die inzwischen sehr viel stärkere Gefäßwand der Arterien stattfinden, welche deutlich mehr Isolectin B4 bindet als die dünnere Venenwand. Weiterhin sind auch die Abgänge der kleineren Arteriolen von den Arterien im Gegensatz zu den Venen mit einer extrem auffälligen und hellen Isolectin-Färbung auf dem *flatmount* markiert. Diese ist in höheren Vergrößerungen noch besser zu erkennen. Die beschriebenen Gefäßstrukturen gelten ohne Ausnahme für alle Gruppen.

Es fallen weiterhin multiple Extravasationen verschiedener Größe sowie Veränderungen in der Gefäßversorgung der retinalen Peripherie der Augen A-L und C-L auf. Hier ist schon in der Übersichtsaufnahme eine verminderte Vaskularisation in den Bereichen nahe der *Ora serrata* erkennbar, welche in C-L stärker ausgeprägter ist als in A-L. Offensichtlich sind davon sowohl der oberflächliche als auch der tiefe Gefäßplexus betroffen, da schon in dieser geringen Vergrößerung zu erkennen ist, dass die Netzhaut abschnittsweise mit keinerlei Gefäßen versorgt wird. Diese Veränderungen beschränken sich auf die äußerste Peripherie der Retina. Im inferioren Netzhautteil von C-L fallen zusätzlich Auftreibungen der Gefäßenden am Übergang von der vaskularisierten zur avaskulären Netzhaut auf (besonders starke Isolectin-Färbung).

Die beschriebenen Ergebnisse machen deutlich, dass sich in einer bloßen Übersichtsaufnahme der Netzhaut keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Gruppen finden lassen. Die Gefäßentwicklung wirkt, mit einigen Ausnahmen, auf den ersten Blick für alle Augen ähnlich.

Aus diesem Grund sind höhere Vergrößerungen bzw. detailorientierte Quantifizierungsmethoden unumgänglich, um latente Veränderungen darzustellen und näher untersuchen zu können. Diese Analysen und deren Ergebnisse sollen in Abschnitt 3.1.4. vorgestellt werden.



**Abbildung 38: Beispielpflichte Darstellung der Versuchsnetzhäute an P21**  
 Versuchsgruppen A-D (a), (c), (e), (g) linkes Auge; (b), (d), (f), (h) rechtes Auge;  
 grün: Isolectin B4

### **3.1.4. Gefäßanalysen auf *flatmounts***

Die Anfertigung und Analysemethoden für *flatmounts* werden in 2.3.2.1. erklärt.

#### **3.1.4.1. Expansion des tiefen Gefäßplexus**

Untersucht wird hierbei die Ausdehnung des tiefen Gefäßplexus in Bezug auf die Gesamtfläche der Netzhaut an P11 und P21, die Ergebnisse sind in Abbildung 39 dargestellt (die zugehörigen Zahlenwerte finden sich im Anhang, Tabellen 24 und 25).

Für die Analyse der Plexusentwicklung in Gruppe D muss zwischen rechtem und linkem Auge keine Seitenunterscheidung vorgenommen werden, da diese Gruppe keine UCL erhalten hat und somit beide Augen gleich behandelt wurden. In dieser Gruppe kann für P11 aus den einzelnen Versuchen ein Mittelwert von 54,2% berechnet werden, das heißt der tiefe Plexus bedeckt an P11 im Schnitt 54,2% der Gesamtfläche der Netzhaut (Abbildung 39 (a)).

In Gruppe A haben alle Tiere eine UCL auf der linken Halsseite erhalten und wurden danach für 1h in 6% Sauerstoff verbracht. Aufgrund der OP muss in dieser Gruppe stets eine Seitenunterscheidung zwischen linkem und rechtem Auge vorgenommen werden (A–L und A–R). Für A-L ergibt sich aus den einzelnen Versuchen ein Mittelwert von 39,7% an P11, das heißt der tiefe Gefäßplexus bedeckt am 11. Lebensstag der Ratten ca. 40% der gesamten Netzhautfläche. Der Mittelwert für das rechte Auge der Gruppe A (A-R) beträgt an P11 53,0% und liegt damit deutlich über dem Wert von A-L und eher im Bereich der Kontrollgruppe.

Bei Gruppe B kann auf eine Seitenunterscheidung zwischen den Augen verzichtet werden, da diese Tiere keine OP erhalten haben sondern für 24h in eine 80%ige Hyperoxie verbracht worden sind. Der tiefe Plexus bedeckt in dieser Gruppe an P11 im Durchschnitt 47,6% der Netzhaut.

In Gruppe C haben alle Tiere eine UCL auf der linken Halsseite erhalten, bevor sie für 1h in eine 6%ige Hypoxie und danach für 24h in 80% Hyperoxie verbracht worden sind. Aufgrund der stattgefundenen OP muss in dieser Gruppe stets eine Seitenunterscheidung zwischen linkem (C-L) und rechtem Auge (C-R) vorgenommen werden. In C-L hat der tiefe Plexus an P11 45% der Netzhaut vaskularisiert. Im

rechten Auge der Gruppe C (C-R) bedeckt er zu diesem Zeitpunkt bereits 50,3% der Retina.

Im Vergleich zu P11 ist an P21 die Plexusentwicklung schon sehr viel weiter fortgeschritten, jedoch teilweise noch nicht abgeschlossen (Abbildung 39 (a)).

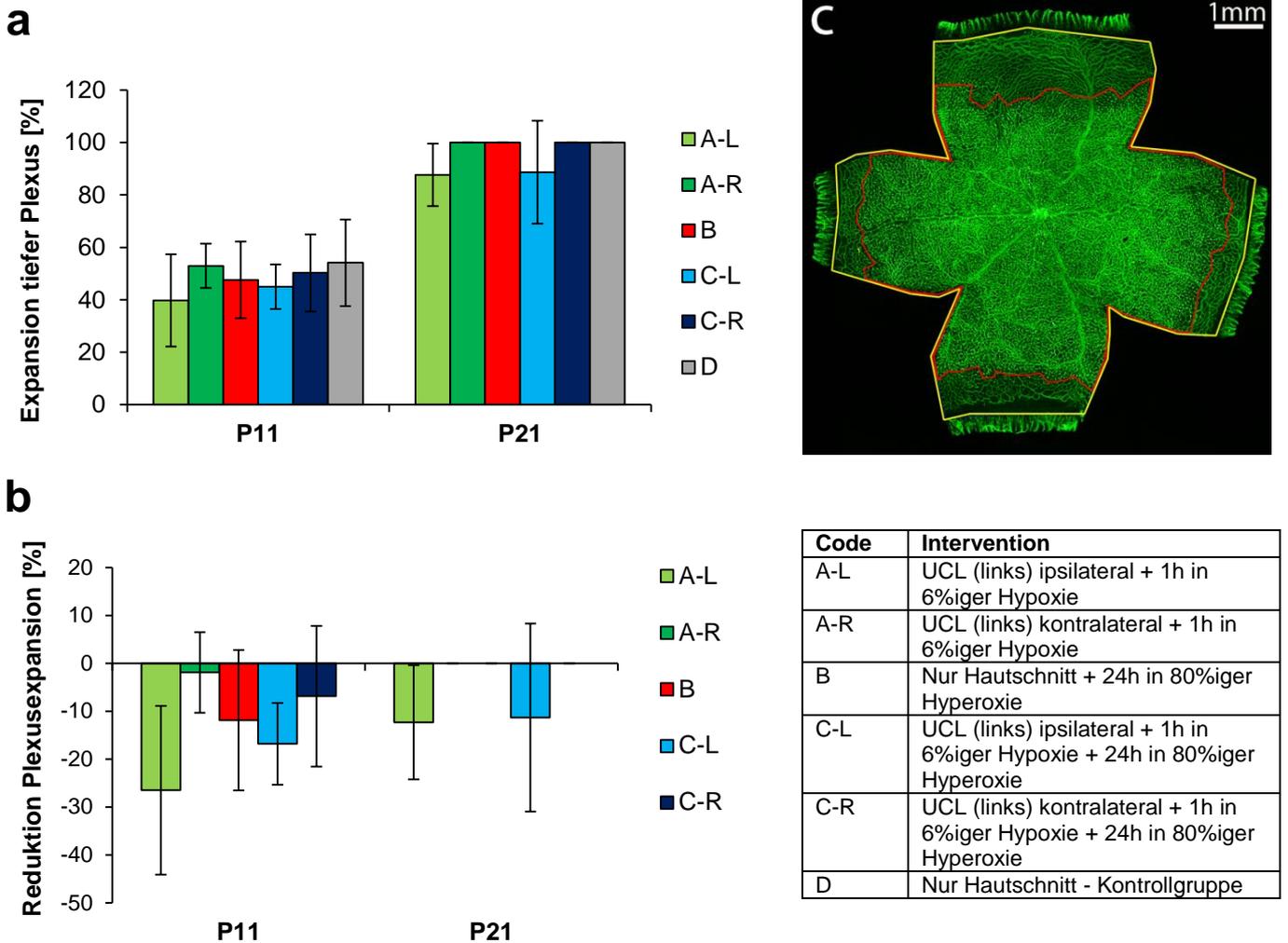
Die Gruppen D und B zeigen an P21 eine vollständig abgeschlossene Entwicklung des tiefen Gefäßplexus, dieser überzieht in beiden Gruppen 100% der Netzhaut. Auch A-R und C-R weisen eine Ausbreitung des tiefen Plexus über 100% der Retina auf. Auffällig sind dagegen A-L und C-L. Hier bedeckt der tiefe Plexus an P21 87,6% bzw. 88,6% der Netzhaut, was eine deutliche Reduktion bzw. Verzögerung im Vergleich zur Kontrollgruppe bedeutet.

Betrachtet man nun die Ergebnisse für die Entwicklung des tiefen Gefäßplexus an P11 im Vergleich zur Kontrollgruppe, so fällt eine Verzögerung der Plexusentwicklung vor allem in den Augen mit OP-Intervention auf (siehe Abbildung 39 (b)). So ist an P11 im Vergleich zu D für A-L eine Verzögerung von 26,5% und für C-L von 16,8% zu beobachten. Für A-R, B und C-R ist die Verzögerung weniger stark ausgeprägt, sie beträgt jeweils 1,91%, 11,9% und 6,88%.

Die Veränderungen an P21 beschränken sich auf die linken Augen der Gruppen A und C. So zeigt sich für A-L eine Wachstumsverzögerung von 12,3% im Vergleich zu D, während sich für C-L ein ähnlicher Wert, nämlich 11,3% ergibt. A-R, B und C-R weisen an P21 keine Wachstumsverzögerung des tiefen Plexus auf, welcher in diesen Gruppen die Netzhaut zu 100% bedeckt.

Die aufgezeigten Wachstumsverzögerungen des tiefen Plexus an P11 und P21 sind zwar deutlich, jedoch führen die Schwankungen zwischen den Werten der einzelnen Versuche und die limitierte Tierzahl dazu, dass sich die Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und Interventionsgruppe nach statistischer Untersuchung jeweils als nicht signifikant zueinander erweisen.

Die größte Verzögerung im Wachstum des tiefen Gefäßplexus weisen, sowohl an P11, als auch an P21, A-L und C-L auf.



**Abbildung 39: Expansion des tiefen Gefäßplexus an P11 und P21**

(a) Relative Expansion des tiefen Gefäßplexus an P11 und P21 in allen Versuchsgruppen; angegeben in Prozent der retinalen Gesamtfläche (b) Reduktion der Plexusausdehnung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Nulllinie) (c) Messung auf dem *flatmount*-Präparat zur Ermittlung der Ausdehnung des tiefen Plexus; grün: Isolectin B4, rote Linie: tiefer Gefäßplexus, gelbe Linie: Gesamtfläche der Retina

Zur Bestätigung der dargestellten Ergebnisse wird die Ausbreitung des tiefen Gefäßplexus zusätzlich auf Kryoschnitten, welche aus den *flatmounts* einer kompletten Versuchsrunde angefertigt werden, überprüft. Die Korrelation der Plexusentwicklung auf *flatmounts* und Kryoschnitten soll nicht zur Quantifizierung, sondern lediglich zur Veranschaulichung der oben dargestellten Verzögerungen in der Entwicklung des tiefen Gefäßplexus dienen.

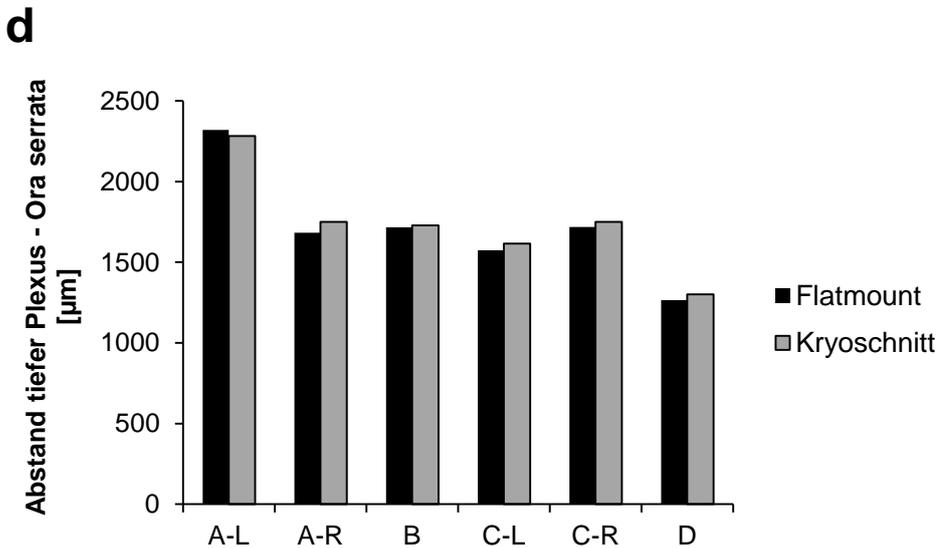
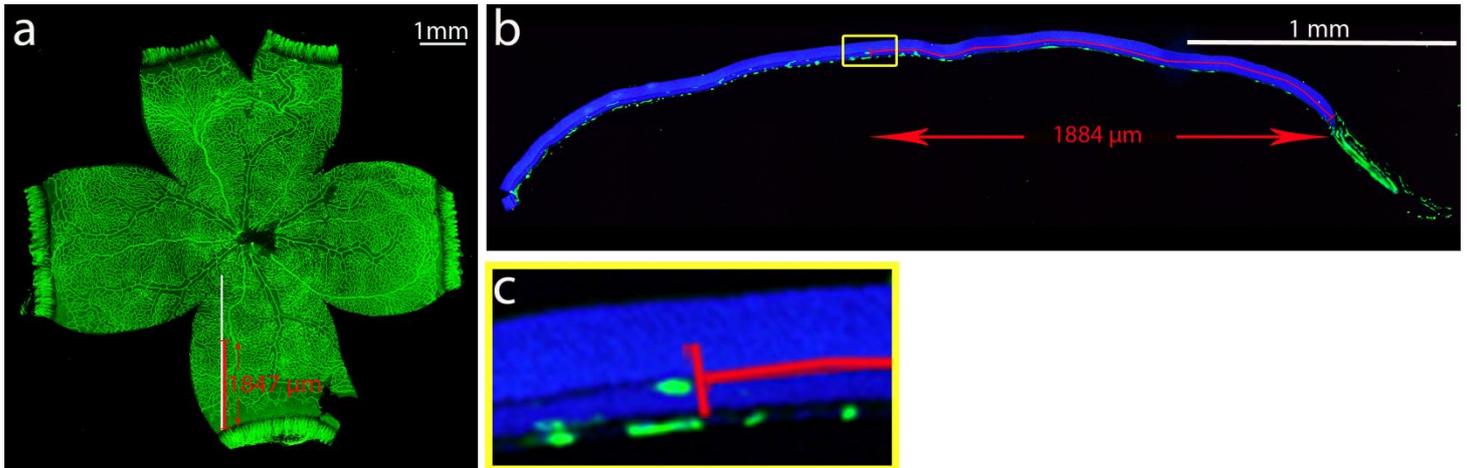
In Abbildung 40 (a) - (c) ist beispielhaft die Vorgehensweise zur Korrelation der beiden Techniken dargestellt, es handelt sich auf allen Bildern um dasselbe Präparat (P11 Netzhaut aus Gruppe B). Auf dem Kryoschnitt werden die Zellkerne durch die DAPI-Färbung in blau, die Gefäße durch Isolectin B4 in grün markiert. Die

Kryoschnitte werden jeweils aus dem inferioren Teil der Netzhaut entnommen und zeigen einen Querschnitt durch die halbe Retina, von zentral bis peripher (Lokalisation auf dem *flatmount*: siehe weiße Markierung in (a)). Die oberflächliche Gefäßschicht der Retina ist im Kryoschnitt auf der NFL sichtbar, während die tiefe Gefäßschicht in der OPL zu erkennen ist. Der periphere Rand der Netzhaut ist durch die grün angefärbte *Ora serrata* deutlich markiert. In rot sind auf *flatmount* und Kryoschnitt jeweils die peripheren Bereiche vermessen, welche der tiefe Plexus an P11 noch nicht vaskularisiert hat. In der zentralen Netzhaut bis zum Beginn der roten Messung hat sich die tiefe Gefäßschicht bereits gebildet. Gemessen wird nun der Abstand zwischen *Ora serrata* und dem ersten vaskulären Spross des tiefen Plexus. Die ermittelten Werte für *flatmount* und Kryoschnitt sind in Abbildung 40 (d) dargestellt.

Für die Kontrollgruppe D ergibt sich nach Mittelung der Messungen in linkem und rechtem Auge im *flatmount* ein Abstand von 1265  $\mu\text{m}$ , auf dem Kryoschnitt sind es 1301  $\mu\text{m}$ .

In A-L wird auf dem *flatmount* eine Entfernung des tiefen Gefäßplexus von der *Ora serrata* von 2321  $\mu\text{m}$  gemessen, auf dem Kryoschnitt sind es 2282  $\mu\text{m}$ . In A-R beträgt der „*flatmount*-Abstand“ dagegen nur 1683  $\mu\text{m}$  und der „Kryo-Abstand“ 1750  $\mu\text{m}$ , deutlich weniger als in A-L. Für Gruppe B werden auf dem *flatmount* 1716  $\mu\text{m}$  und auf dem Kryoschnitt 1729  $\mu\text{m}$  Entfernung zwischen der vaskulären Front des tiefen Plexus und *Ora serrata* gemessen. In C-L beläuft sich der Abstand auf 1574  $\mu\text{m}$  auf dem *flatmount* und 1615  $\mu\text{m}$  auf dem Kryoschnitt, während die Werte für C-R 1719  $\mu\text{m}$  und 1750  $\mu\text{m}$  betragen.

Entscheidend ist, dass die Abstandsmessungen auf *flatmount* (schwarz) und Kryoschnitt (grau) in jeder Gruppe nahezu identische Werte aufweisen (Abbildung 40 (d)). Die Korrelation der beiden Techniken gelingt demnach, sodass die oben ermittelten Ergebnisse bezüglich der Entwicklung des tiefen Gefäßplexus bestätigt werden können. Die Ausbreitung des tiefen Gefäßplexus ist in sämtlichen Interventionsgruppen verzögert, die Abstände zwischen tiefem Plexus und *Ora serrata* sind in A-L, A-R, B, C-L und C-R jeweils größer als in D. Der gemessene Abstand und damit die Wachstumsverzögerung ist (sowohl auf den *flatmounts* als auch auf den Kryoschnitten) in A-L mit ca. 2300  $\mu\text{m}$  am größten.



**Abbildung 40: Korrelation der Plexusexpansion auf *flatmount* und Kryoschnitt**

Ausdehnung des tiefen retinalen Gefäßplexus auf *flatmount*-Präparat (a) und Kryoschnitt (b),(c) derselben Netzhaut; (c) zeigt den Bildausschnitt aus (b) in höherer Vergrößerung; die Entfernung vom ersten Spross des tiefen Plexus bis zur *Ora serrata* wird jeweils in rot gemessen; grün: Isolectin B4, blau: DAPI (d) Graphische Darstellung und Korrelation der auf *flatmounts* und Kryoschnitten gemessenen Entfernungen zwischen tiefem Plexus und *Ora serrata*; schwarz: Flatmount, grau: Kryoschnitt

### 3.1.4.2. Durchmesser der großen Gefäße

An den Netzhäuten der Versuchstiere wurden auch die Durchmesser (GD = Gefäßdurchmesser) der großen Arterien und Venen an P11 und P21 in der zentralen Retina und der mittleren Peripherie untersucht. Signifikante Abweichungen von der Norm können hierbei hauptsächlich bei den Arteriendurchmessern gefunden werden.

### **3.1.4.2.1. Durchmesser der großen Arterien**

#### **3.1.4.2.1.1. Vergleich Interventionsgruppen mit Kontrollgruppe**

Begonnen wird mit der Beschreibung des Arterien­durchmessers im Vergleich zur Kontrollgruppe an P11 (siehe Abbildung 41 (a), Zahlenwerte im Anhang, Tabelle 27). In der zentralen Netzhaut fallen hier in den Gruppen A – C nur geringfügige Veränderungen des GD im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Es kann eine minimale Erhöhung des GD in beiden Augen der Gruppe A (ca. 2,5%), sowie eine Reduktion des GD in den Gruppen B und C (für C-L ca. 12%) beobachtet werden. Diese Veränderungen sind jedoch so gering, dass sich keine signifikanten Unterschiede zum zentralen GD in der Kontrollgruppe berechnen lassen.

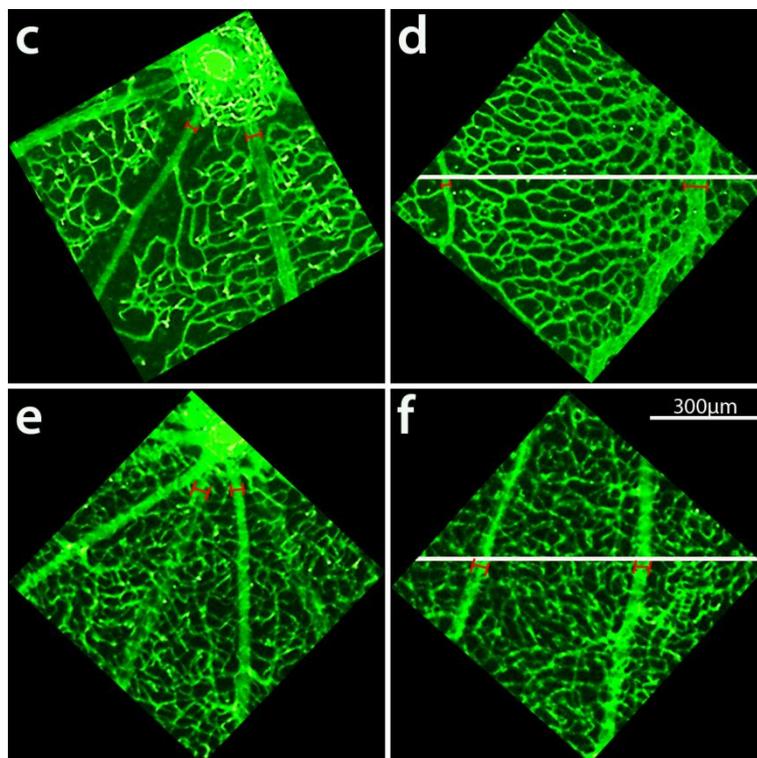
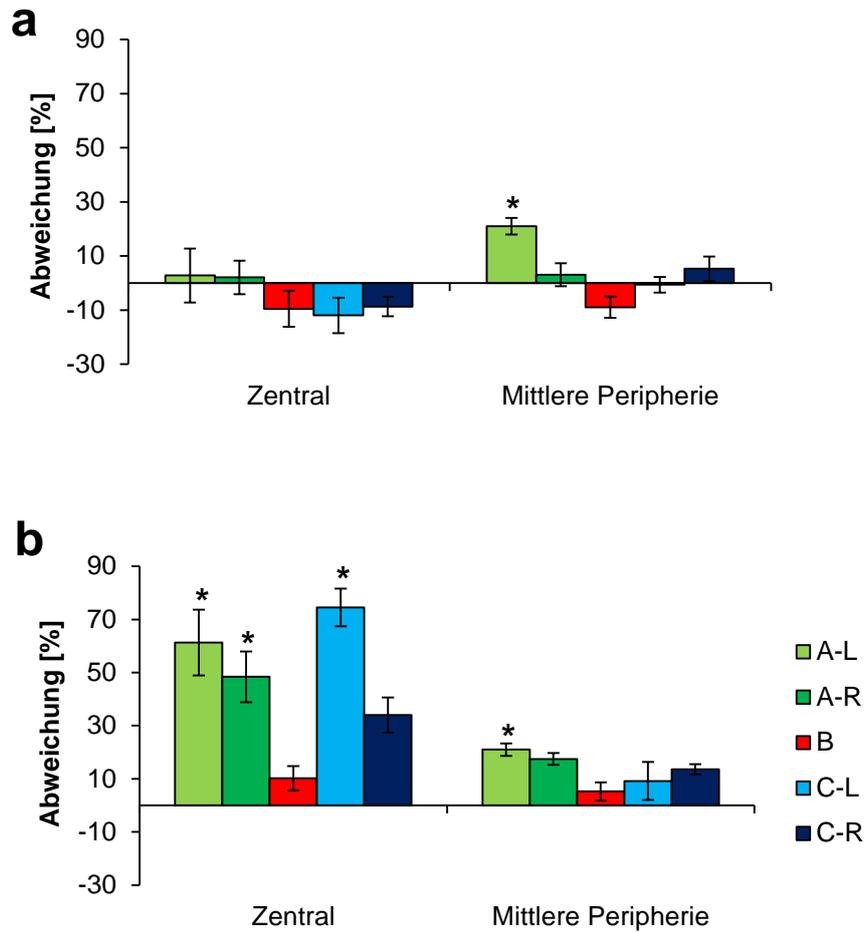
In der mittleren Peripherie sind in Auge A-L signifikante Abweichungen von der Normgruppe zu finden. Weist die Normoxiegruppe hier einen mittleren GD von 29,4 µm auf, so ist dieser in A-L auf 35,5 µm vergrößert (Werte nicht in Abbildung dargestellt), was einer Erhöhung von 21% entspricht. Eine Reduktion des GD um knapp 9% in Gruppe B bzw. eine Erhöhung des GD um 5% in C-R lassen sich zwar beobachten, erweisen sich jedoch als nicht signifikant.

Die schwerwiegenden Veränderungen finden sich in Abbildung 41 (b) an P21 (Zahlenwerte in Tabelle 28). Die zentralen arteriellen GD in A-L, A-R und C-L sind hier im Vergleich zu D deutlich erhöht. So kommt es in A-L zu einer signifikanten Steigerung um 61%, auch für A-R lässt sich eine signifikante Erhöhung des GD um 48% errechnen. Die Veränderungen des GD in Gruppe B sind in der zentralen Netzhaut an P21 nur minimal, für C-L jedoch ergibt sich hier auffälligste Veränderung des GD. Es kann eine signifikante Erhöhung des GD von 74% im Vergleich zur Kontrollgruppe verzeichnet werden, was einem mittleren arteriellen GD von 56 µm im Vergleich zu 32 µm in Gruppe D entspricht. Auch der GD in C-R ist deutlich vergrößert.

Die arteriellen GD in der mittleren Peripherie in den Netzhäuten der 21 Tage alten Tiere sind weniger dramatisch. Hier ist lediglich eine signifikante Erhöhung von 31,17 µm in der Kontrollgruppe auf 37,72 µm in A-L zu verzeichnen, was einer Steigerung des GD von 21% entspricht. Die GD der übrigen Augen sind zwar allesamt im

Vergleich zur Gruppe D erhöht (z.B. 17% in A-R und 13% in C-R), diese Werte entsprechen jedoch keiner signifikanten Steigerung des GD.

Für die Veränderungen des arteriellen GD an P11 und P21 lässt sich aus diesen Ergebnissen eindeutig eine maximale Schädigung für das jeweils linke Auge von Gruppe A und Gruppe C erkennen, welche sich in teilweise dramatischen Erhöhungen des GD widerspiegelt. Die rechten Augen der genannten Gruppen sowie die Augen der Gruppe B weisen zwar ebenfalls Veränderungen auf, diese sind jedoch weniger auffällig und im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant.



**Abbildung 41: Abweichungen im arteriellen Gefäßdurchmesser**  
**(a), (b)** Abweichungen der arteriellen GD in Gruppe A, B und C von der Kontrollgruppe an P11 **(a)** und P21 **(b)** \* $p < 0,05$ ; **(c)-(d)** Messungen zur Bestimmung des GD auf *flatmount*-Präparaten; P11 in der zentralen **(c)** und mitt-peripheren **(d)** Netzhaut; P21 in der zentralen **(e)** und mitt-peripheren **(f)** Netzhaut; grün: Isolectin B4, rot: GD-Messungen

### 3.1.4.2.1.2. Zeitlicher Entwicklungsverlauf (P11 vs. P21)

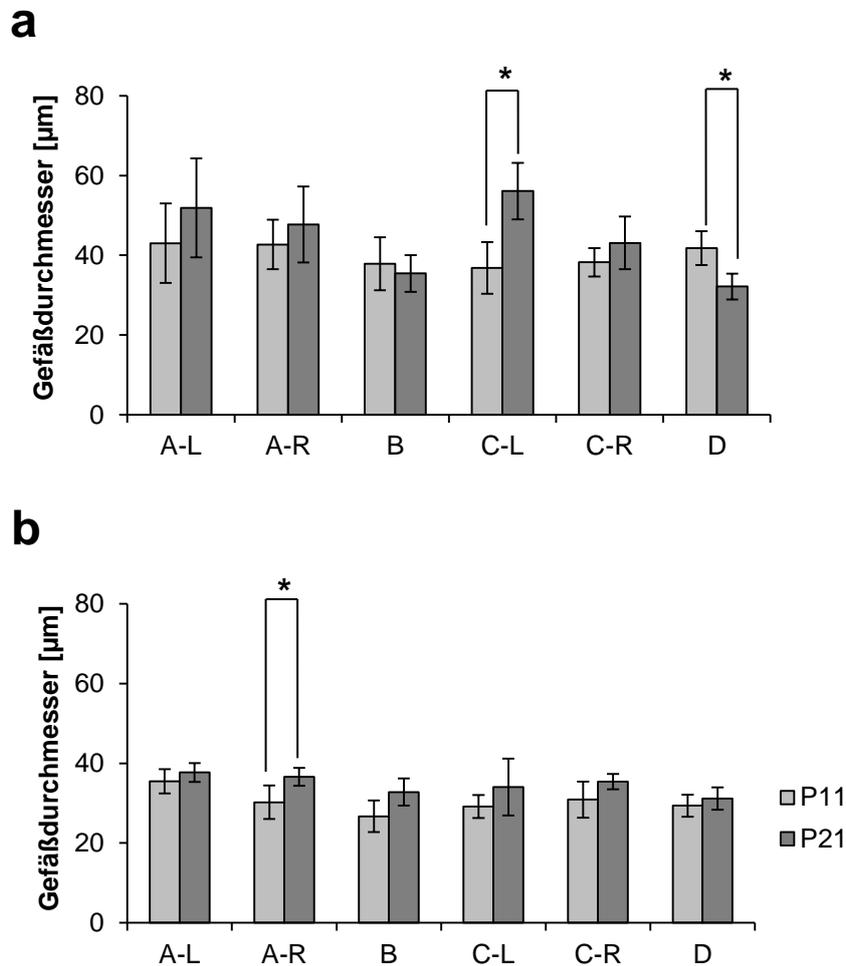
Zur Analyse der zeitlichen Entwicklung werden nun die GD zwischen P11 und P21 innerhalb einer Gruppe verglichen, die Auswertung findet dabei sowohl in der zentralen, als auch in mitt-peripheren Netzhaut statt (Abbildung 42 (a), (b)).

In der zentralen Netzhaut (siehe Abbildung 42 (a), Zahlenwerte in Tabelle 29) der Kontrollgruppe D zeigt sich eine signifikante Reduktion des arteriellen GD von 41,83  $\mu\text{m}$  an P11 auf 32,17  $\mu\text{m}$  an P21 (dies entspricht einer Reduktion von 23%). Auch in Gruppe B findet in der zentralen Netzhaut zwischen P11 und P21 eine (wenn auch nicht signifikante) Reduktion des arteriellen GD von 37,85  $\mu\text{m}$  auf 35,44  $\mu\text{m}$  (6,4%) statt.

Eine gegensätzliche Entwicklung des arteriellen GD ist dagegen in den beiden UCL-Gruppen (A und C) zu verzeichnen, hier kommt es zu einer Erhöhung des arteriellen GD zwischen P11 und P21. Während sich dabei für C-L eine signifikante Erhöhung von 36,84  $\mu\text{m}$  auf 56,13  $\mu\text{m}$  (52%) ergibt, weisen auch die Augen A-L, A-R und C-R deutliche Steigerungen des GD auf. Diese bewegen sich im prozentualen Bereich zwischen 10% und 20%.

Die Veränderungen des arteriellen GD in der mittleren Peripherie sind weniger deutlich und in Abbildung 42 (b) dargestellt (Zahlenwerte in Tabelle 30). Während sich der GD in der Kontrollgruppe zwischen P11 und P21 fast gar nicht verändert, kann in sämtlichen Augen der Versuchsgruppen eine minimale Erhöhung des GD gemessen werden. Diese Veränderungen sind jedoch äußerst gering und sollen hier deshalb nicht genauer angeführt werden.

Zusammenfassend kommt es in allen Interventionsgruppen (im Gegensatz zur Kontrollgruppe) zentral zu einer Erhöhung des arteriellen GD zwischen P11 und P21, die Erhöhung ist dabei in A-L und C-L am stärksten ausgeprägt.



**Abbildung 42: Zeitlicher Entwicklungsverlauf des arteriellen GD**  
**(a)** Arterieller GD in der zentralen Netzhaut **(b)** Arterieller GD in der mittleren Peripherie; hellgrau: P11, dunkelgrau: P21; \* $p < 0,05$

### 3.1.4.2.1.3. Räumlichen Entwicklungsverlauf (zentral vs. mittlere Peripherie)

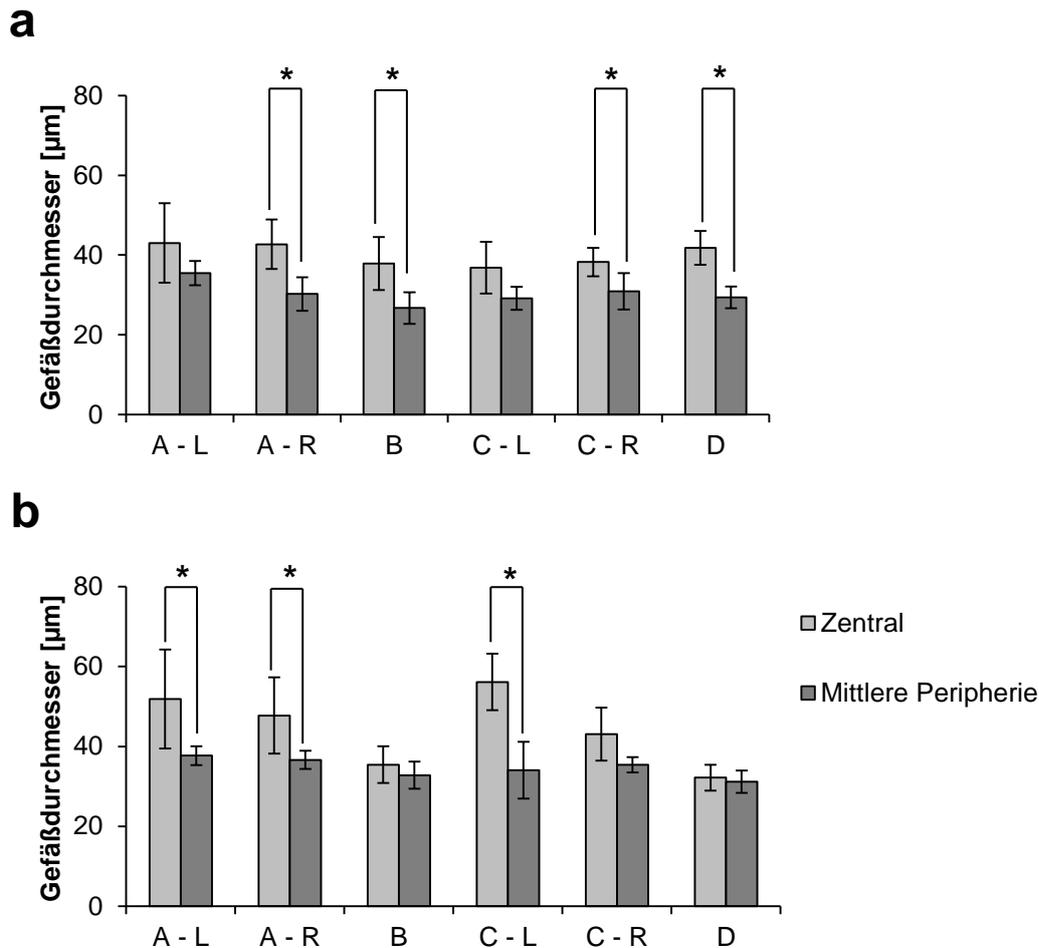
Auch die Betrachtung des räumlichen Entwicklungsverlaufs innerhalb einer Gruppe liefert interessante Ergebnisse. Verglichen werden hierfür jeweils für P11 und P21 innerhalb einer Versuchsgruppe die Werte des arteriellen GD in der zentralen Netzhaut mit denen in der mittleren Peripherie.

Die Ergebnisse der Kontrollgruppe zeigen an P11 (siehe Abbildung 43 (a), Zahlenwerte im Anhang, Tabelle 31) eine signifikante Abnahme des GD von 41,83 µm in der zentralen Retina auf 29,40 µm in der mittleren Peripherie (29,9%), dies ist ein physiologischer Vorgang. Auch in den Gruppen B, A-R und C-R lässt sich jeweils eine Reduktion des GD beobachten. So beläuft sich in den Arterien der rechten Augen der Gruppen A und C die Reduktion des GD auf deutlich signifikante Werte.

In A-R beträgt der mittlere arterielle GD an P11 in der zentralen Netzhaut 42,70  $\mu\text{m}$  und in der mittleren Peripherie 30,25  $\mu\text{m}$ , was einer Reduktion von 29,2% entspricht, und in C-R 38,25  $\mu\text{m}$  zentral und 30,90  $\mu\text{m}$  mitt-peripher (Reduktion um 19,2%). Für B lässt eine Verminderung des GD von 17,52  $\mu\text{m}$  auf 14,82  $\mu\text{m}$  berechnen, was genau wie in Gruppe D einer prozentualen Abnahme des GD von 29% entspricht. Auffällig sind hier erneut die linken Augen der Gruppen A und C. Zwar kommt es auch hier zu einer Reduktion des GD zwischen zentral und mitt-peripher (A-L 17,5% und C-L 20,9%), jedoch ist diese Abnahme des GD im Vergleich zu den anderen Gruppen deutlich abgeschwächt und allein in diesen beiden Gruppe nicht signifikant.

An P21 (Abbildung 43 (b), Zahlenwerte in Tabelle 32) haben sich in der Kontrollgruppe die zentralen und mitt-peripheren arteriellen GD nahezu angeglichen (physiologische Abnahme des GD um 3,1% von 32,17  $\mu\text{m}$  auf 31,17  $\mu\text{m}$ ), ein Bild, was sich auch in Gruppe B zeigt. Hier wird eine äußerst geringe Reduktion des GD von nur 7% ermittelt. Für A-L ergibt sich dagegen eine signifikante Erniedrigung des arteriellen GD um 27% (von 51,90  $\mu\text{m}$  zentral auf 37,72  $\mu\text{m}$  mitt-peripher). Im rechten Auge der Gruppe A beträgt die prozentuale Reduktion des GD 23%, was ebenfalls einem signifikanten Unterschied zwischen dem zentralen (GD 47,74  $\mu\text{m}$ ) und dem mitt-peripheren GD (36,63  $\mu\text{m}$ ) entspricht. Auch in beiden Augen der Gruppe C sind die Unterschiede zwischen den zentralen und mitt-peripheren Werten sehr deutlich ausgeprägt, so beträgt die Reduktion in C-L 39% und in C-R 18%.

Die gefundenen Ergebnisse machen deutlich, dass die arteriellen GD in den Netzhäuten von A-L und C-L sowohl an P11 als auch an P21 starke Veränderungen aufweisen, die auf eine Verzögerung im Gefäßwachstum bzw. -reifung hinweisen. Die in der Normoxie-Gruppe vorhandene, starke Reduktion des GD zwischen zentral und mitt-peripher ist in den genannten Augen an P11 deutlich abgeschwächt. Dafür ist hier dann an P21 eine deutliche Verminderung des GD zu beobachten, während sich die arteriellen GD zwischen zentral und mitt-peripher in der Kontrollgruppe zu diesem Zeitpunkt schon fast einander angeglichen haben.



**Abbildung 43: Räumlicher Entwicklungsverlauf des arteriellen GD**

(a) Arterieller GD an P11 (b) Arterieller GD an P21; hellgrau: zentral, dunkelgrau: mittlere Peripherie; \*p<0,05

### 3.1.4.2.2. Durchmesser der großen Venen

Die Ergebnisse der Venenanalyse sind insgesamt weniger aussagekräftig. Es sollen hier deshalb nur die wichtigsten Daten kurz vorgestellt werden.

#### 3.1.4.2.2.1. Vergleich Interventionsgruppen mit Kontrollgruppe

Die zentralen Durchmesser der großen Venen weisen an P11 in allen Gruppen eine Reduktion des GD im Vergleich zur Kontrollgruppe auf, wobei jedoch keiner dieser Werte ein signifikantes Niveau erreicht. In der mittleren Peripherie kommt es in den

linken Augen der Gruppen A und C zu einer Erhöhung des GD, während die übrigen Augen (A-R, B und C-R) eine leichte Abnahme des mittleren venösen GD zeigen. Diese Veränderungen sind zwar im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich, jedoch aufgrund des Schwankungsbereichs der Einzelwerte nicht signifikant.

Die GD der großen Venen an P21 werden zwar untersucht, die Ergebnisse sollen hier jedoch aufgrund nur minimaler Veränderungen nicht dargestellt werden.

#### **3.1.4.2.2.2. Zeitlicher Entwicklungsverlauf (P11 vs. P21)**

Die bei den Arterien bereits beschriebenen Veränderungen bezüglich des zeitlichen Entwicklungsverlaufs in der zentralen Retina finden sich in abgeschwächter Weise bei den Venen wieder.

In der zentralen Netzhaut lässt sich demnach in der Kontrollgruppe eine physiologische Reduktion des GD zwischen P11 und P21 nachweisen (54,63 µm auf 51,55 µm). Diese zentrale Reduktion ist sonst in keiner Gruppe zu beobachten, denn sowohl in beiden Augen der Gruppe A, als auch in den Gruppen B und C, findet eine Erhöhung des venösen GD zwischen P11 und P21 statt. Die Veränderungen sind durchweg von kleinem Ausmaß und können hier lediglich einen allgemeinen Trend innerhalb der Gruppe angeben. Einzig für A-R lässt sich eine signifikante Erhöhung des GD von 45,84 µm an P11 auf 54,81 µm an P21 feststellen.

In der mittleren Peripherie lässt sich durchweg in den Gruppen A bis D eine Reduktion des venösen GD zwischen P11 und P21 finden. Auch diese Veränderungen sind nicht signifikant und sollen deshalb lediglich kurz erwähnt werden.

#### **3.1.4.2.2.3. Vergleich des räumlichen Entwicklungsverlaufs (zentral vs. mittlere Peripherie)**

Bezüglich der Veränderungen des venösen GD zwischen der zentralen und der mitt-peripheren Netzhaut an P11 können allenfalls Trends beobachtet werden, es handelt

sich nicht um signifikante Unterschiede. Während es in der Kontrollgruppe (und auch in A-R, B und C-R) zu einer geringfügigen Abnahme des GD kommt, ist in den linken Augen der Gruppen A und C dagegen eine Erhöhung des venösen GD zu beobachten.

An P21 ist in der Kontrollgruppe eine deutliche und signifikante Reduktion des venösen GD zwischen zentral und mitt-peripher um 19 % nachweisbar. Dieses Bild lässt sich auch in A-R (Reduktion um 24%) und in Gruppe B (Reduktion um 27%) finden, wohingegen die Reduktion in A-L (6%), C-L (10%) deutlich abgeschwächt und nicht signifikant ist.

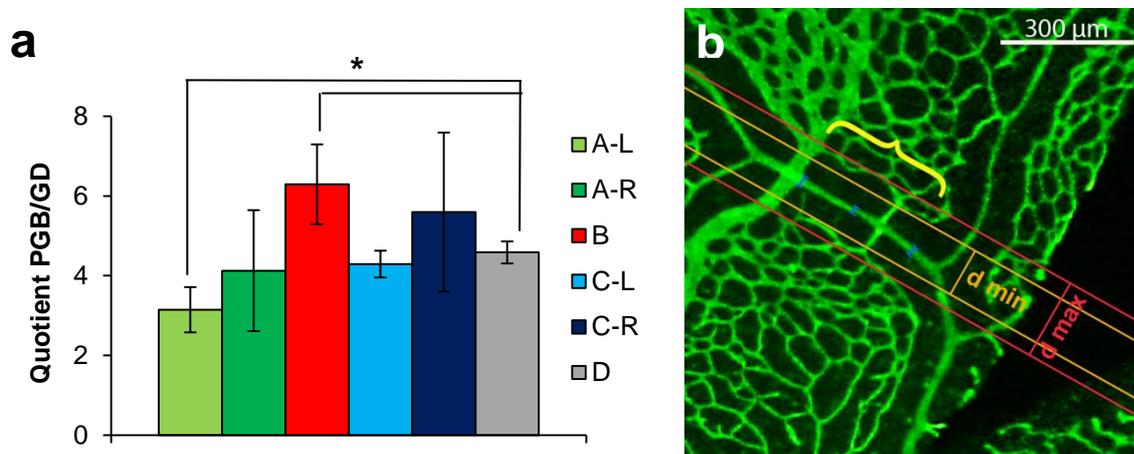
### **3.1.4.3. Periarteriell gefäßfreie Bereiche (PGB)**

Ebenfalls untersucht werden die in 1.2.1.5. beschriebenen periarteriell gefäßfreien Bereiche oder auch *capillary free zones* [34]. Diese entstehen im Rahmen des *vascular remodeling* und stellen sich als kapillarfreie Bereiche in Nachbarschaft zu den großen Arterien des oberflächlichen Plexus dar. Durch Sauerstoffdiffusion und Apoptosevorgänge kommt es hier zum Absterben von Kapillarendothelzellen bzw. ausbleibender Entwicklung von Kapillaren in retinalen Bereichen mit besonders hohen Sauerstoffkonzentrationen. Die Ausdehnung der PGB gibt daher Aufschluss über die Sauerstoffversorgung des Gewebes sowie über den Reifezustand des Gefäßsystems [37] [6]. Eine Überversorgung mit Sauerstoff führt demnach zu einer Erweiterung der PGB, während Hypoxie bzw. fehlende Reife sich in besonders schmalen oder nicht vorhandenen PGB widerspiegelt. In dieser Arbeit werden die PGB nicht als absolute Werte, sondern relativ im Verhältnis zum jeweiligen Gefäßdurchmesser im gemessenen Bereich untersucht und aus diesen beiden Werten ein Quotient gebildet. Je größer der Quotient, desto größer ist auch der PGB im Verhältnis zum Gefäßdurchmesser, desto mehr Sauerstoff wurde zugeführt und andersherum.

Untersucht wurden die PGB an P11, eine Analyse der PGB an P21 ist dagegen nicht möglich. Zu diesem Zeitpunkt ist die Entwicklung der tiefen Gefäßschicht schon so weit fortgeschritten, dass diese fast die komplette oberflächliche Schicht „unterwachsen“ hat. Somit sind die PGB in der oberflächlichen Schicht nicht mehr eindeutig zu identifizieren und eine Quantifizierung wird unmöglich.

In Abbildung 44 (Zahlenwerte Tabelle 33) ist zu sehen, dass der Quotient aus PGB und Gefäßdurchmesser (PGB/GD) in der Kontrollgruppe D einen Wert von 4,6 aufweist. Ähnliche Zahlen werden auch für A-R, C-L und C-R ermittelt, hier betragen die Quotienten 4,1, 4,3 und 5,6. In A-L wird dagegen ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe gefunden, hier wird ein PGB/GD von 3,1 ermittelt. In Gruppe B kommt es dagegen zu einer signifikanten Erhöhung des PGB/GD-Quotienten, welcher hier 6,3 beträgt.

Bei einer zusammenfassenden Betrachtung der dargestellten Ergebnisse fällt auf, dass es in Gruppe A im Vergleich zu Gruppe D in beiden Augen zu einer Abnahme des PGB/GD kommt. Die Abnahme ist in A-L sehr viel stärker (32,6%) und signifikant zur Kontrolle. In B und C-R kommt es dagegen zu einem deutlichen Anstieg des Quotienten. Dieser Anstieg ist in B signifikant zur Kontrollgruppe und mit 37% besonders hoch.



**Abbildung 44: Quotient aus PGB und GD, P11**

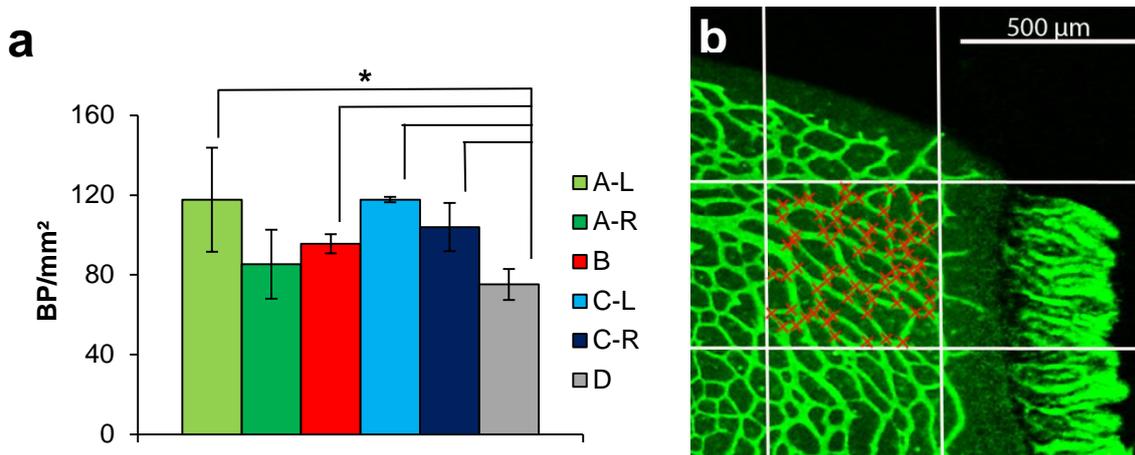
(a) Graphische Darstellung von PGB/GD; \* $p < 0,05$  (b) Messungen auf dem *flatmount*-Präparat zur Bestimmung von PGB und GD; grün: Isolectin B4, gelbe Klammer: analysierter Arterienabschnitt (300µm), rot (d max): maximaler Abstand der kapillären Front von der Arterie (auf dem 300µm langen Abschnitt), orange (d min): minimaler Abstand der kapillären Front von der Arterie (auf dem 300µm langen Abschnitt), blau: dreimalige GD-Messung

#### 3.1.4.4. Branching Points

Die Untersuchungsmethode zur Ermittlung der *Branching Points* (BP) wird in 2.3.2.1.2.4. erklärt. Untersucht werden dabei die Netzhäute sämtlicher Gruppen an P11 (siehe Abbildung 45, Zahlenwerte Tabelle 34). Eine Analyse der BP an P21 ist aufgrund des bis dahin weit fortgeschrittenen Gefäßwachstums des tiefen Plexus nicht mehr möglich und ließe keine Aussage über die Gefäßreifung des oberflächlichen Plexus zu.

An P11 lässt sich in allen Gruppen eine erhöhte Anzahl an BP im Vergleich zur Kontrollgruppe auszählen. In der Kontrollgruppe finden sich pro 1 mm<sup>2</sup> Retina im Schnitt ca. 75 BP. Die größte Steigerung im Vergleich hierzu weist dabei mit durchschnittlich 117,8 BP/mm<sup>2</sup> C-L auf, was einer Erhöhung von 56,59% entspricht. Fast derselbe Wert ergibt sich außerdem bei der Analyse von A-L, dem anderen linken Auge aus einer OP-Interventionsgruppe. Hier werden im Schnitt 117,77 BP/mm<sup>2</sup> gezählt, somit kommt man auf eine Steigerung der BP-Anzahl pro mm<sup>2</sup> Retina von 56,55%. Weiterhin ist die Anzahl der BP auch in C-R stark erhöht und weist hier Werte von durchschnittlich 104 BP/mm<sup>2</sup> auf, was einer Erhöhung von 38,24% im Vergleich zur Kontrollgruppe entspricht. In Gruppe B beträgt die Erhöhung 27,11% und in A-R findet sich die geringste und einzig nicht signifikante Erhöhung von 13,49%.

Zusammenfassend ist die Anzahl der BP in sämtlichen Interventionsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht, wobei die größten Steigerungen in A-L und C-L zu verzeichnen sind.



**Abbildung 45: Branching Points pro mm<sup>2</sup>, P11**

**(a)** Graphische Darstellung der Anzahl an BP pro mm<sup>2</sup>; \*p<0,05 **(b)** Zählung der BP auf dem *flatmount*-Präparat, grün: Isolectin B4, weiß: Fläche 500µm x 500µm, rot: BP (ein Kreuz, wo sich drei Kapillaren treffen usw.)

### 3.1.4.5. Lokale Gefäßpathologien

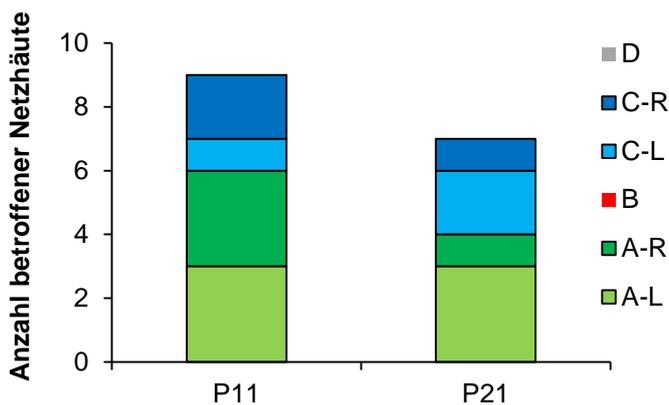
Untersucht werden insgesamt 60 Versuchsnetzhäute, davon 32 im Alter von 11 Tagen und 28 im Alter von 21 Tagen, auf das Vorhandensein lokaler Gefäßpathologien. An P11 werden in 9 von 32 Netzhäuten lokale Gefäßpathologien gefunden, dies entspricht einem Prozentsatz von 28%. An P21 treten in 25% (7 von 28) der untersuchten Retinae lokale Gefäßpathologien auf.

Die Häufigkeit und Verteilung dieser Pathologien auf die verschiedenen Versuchsgruppen bzw. –augen ist in Tabelle 22 und Abbildung 46 dargestellt. Es zeigt sich, dass an P11 die meisten Pathologien in A-L und A-R (jeweils drei Augen) auftreten, C-L und C-R jedoch ebenfalls betroffen sind. Für P21 ergibt sich ein ähnliches Bild, denn auch hier treten die lokalen Gefäßpathologien am häufigsten in A-L auf. Anteilig folgen danach C-L (mit 2 Augen) und A-R sowie C-R. In den Gruppen B und D werden keinerlei lokale Gefäßpathologien gefunden.

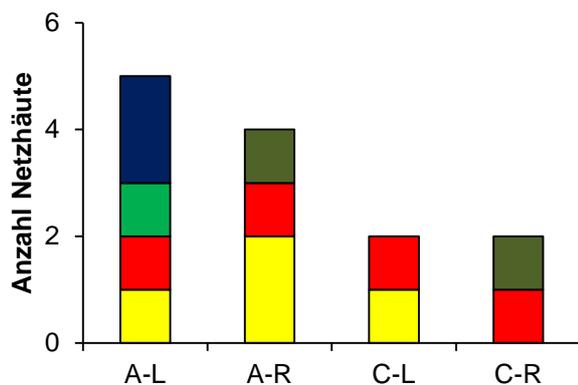
	Tufts	Unvollst.Vask.	AV-Crossing	Vasokonstr	Extravasate	Tortuositas	Auftreten pro Gruppe
P11 A-L	1		1	1		2	3 von 4
P21 A-L		2		1	2	1	3 von 4
P11 A-R	2		1		1		3 von 4
P21 A-R					1		1 von 4
P11 B							0 von 8
P21 B							0 von 8
P11 C-L	1		1				1 von 4
P21 C-L	1	2		1	1		2 von 3
P11 C-R			1		1		2 von 4
P21 C-R			1				1 von 3
P11 D							0 von 8
P21 D							0 von 6
<b>Häufigkeit</b>	<b>5 von 60</b>	<b>4 von 60</b>	<b>5 von 60</b>	<b>3 von 60</b>	<b>6 von 60</b>	<b>3 von 60</b>	

Tabelle 22: Lokale Gefäßpathologien

**a**



**b**



**c**

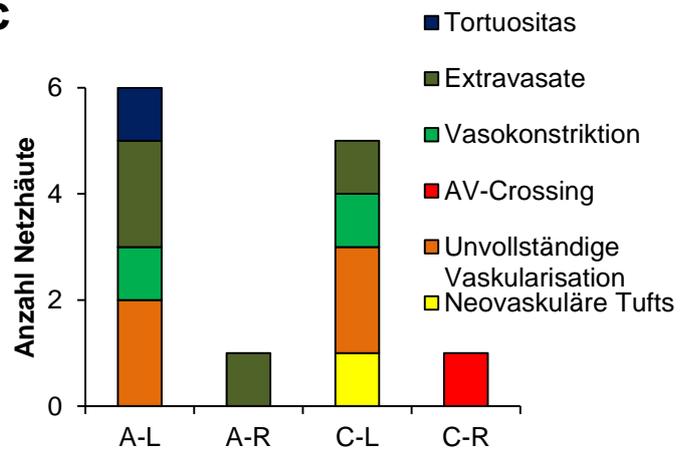


Abbildung 46: Lokale Gefäßpathologien

(a) Häufigkeiten an P11 und P21 (b), (c) Verteilung an P11 (b) und P21 (c)

### 3.1.4.5.1. Neovaskuläre Tufts

Neovaskuläre Tufts gehören zum typischen Bild der ROP in Tiermodellen und auch im Menschen. Die Entwickler des OIR-Mausmodells sowie auch des ROP-Rattenmodells und viele andere Arbeitsgruppen stellten zahlreiche Untersuchungen an, um diese Zubildungen im Tiermodell näher zu charakterisieren. Bei den Tufts handelt es sich demnach um glomeruläre Gefäßknäuel, die teilweise die ILM durchbrechen und in schweren Fällen in den Glaskörper hinein wachsen. Die Tufts weisen intakte Wände aus Endothelzellen auf, sodass es nur selten zu *vascular leakage* kommt [54] [24] [105] und sind von außen mit Perizyten bedeckt [83].

Auch in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Netzhäuten können solche Zubildungen gefunden werden. Da diese Gefäßpathologien im untersuchten Modell eher sporadisch, jedoch ausschließlich in bestimmten Interventionsgruppen auftreten, ist zwar eine Quantifizierung ihrer Auftrittshäufigkeit, jedoch nicht ihrer Beschaffenheit (Größe, Anzahl, Lokalisation, Durchbrechen der ILM usw.) möglich.

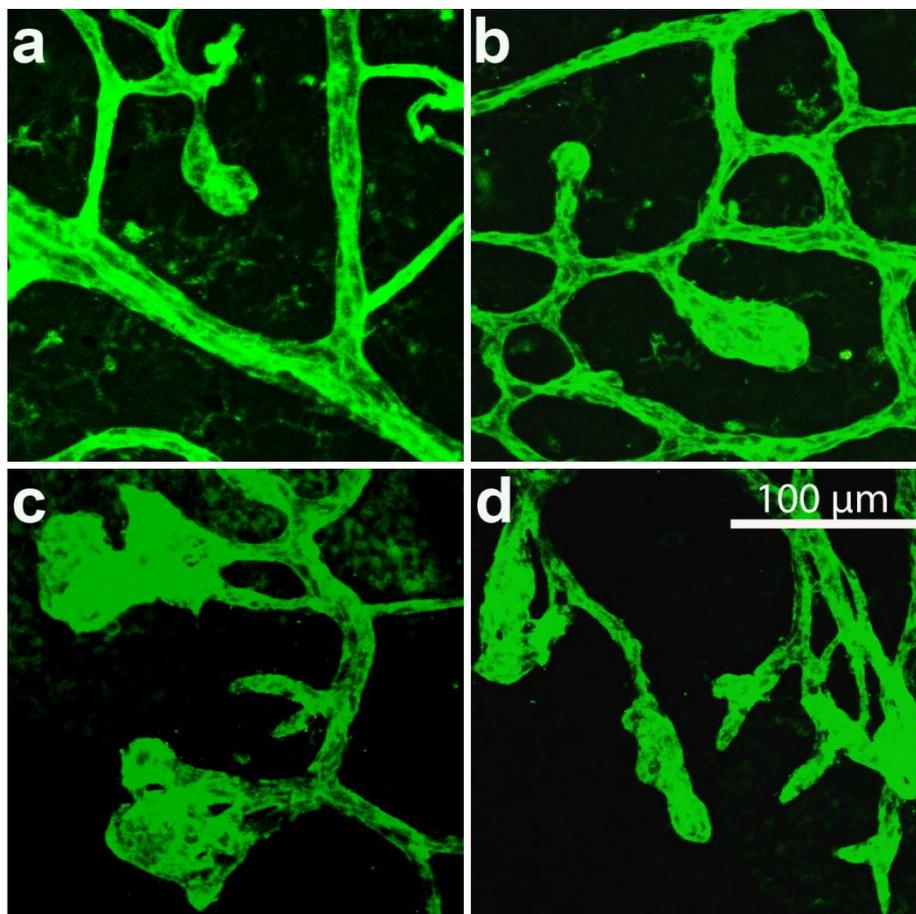
Von den insgesamt 60 untersuchten Netzhäuten werden in fünf Retinae neovaskuläre Tufts gefunden. Sie treten ausschließlich in den Interventionsgruppen A und C auf, dabei fast gleichmäßig verteilt auf P11 in A-L, A-R und C-L und an P21 nur in C-L (siehe Tabelle 22/ Abbildung 46).

Die neovaskulären Tufts unterscheiden sich in ihrer Morphologie nicht maßgeblich zwischen P11 und P21, und auch nicht zwischen den einzelnen Gruppen bzw. Augen. Sie treten an zweierlei Lokalisationen auf.

Zum einen auf der schon vaskularisierten Netzhaut im Nachbarbereich großer Gefäße. Die in 3.1.4.3. beschriebenen PGB stellen dabei bevorzugte Orte für die Bildung derartiger Tufts dar, besonders häufig werden sie neben großen Arterien, und seltener auch Venen, gefunden. Die Zubildungen sind relativ klein und erinnern in der Isolectin B4 Färbung an eine flüssigkeitsgefüllte Blase, deren Wände jedoch intakt sind und mehr glatt als zerklüftet wirken (siehe Abbildung 47 (a) und (b)).

Zum anderen treten die Tufts, ähnlich dem OIR-Mausmodell oder ROP-Rattenmodell, im Übergangsbereich von vaskularisierter zu avaskulärer Netzhaut auf. Sie sind dabei jedoch nicht im kompletten Übergangsbereich, sondern lokal konzentriert an ein bis zwei Stellen auf der Retina auszumachen, dort findet man dann eine regelrechte Ansammlung von vier bis fünf solcher unterschiedlich großer Zubildungen, die in einem Fall auch mit Extravasationen assoziiert sind.

Morphologisch sind diese Tufts etwas größer als die oben beschriebenen. Da sie sich am Übergangsbereich zur avaskulären Netzhaut befinden, stellen sie teilweise auch Mischungen aus konfusem, planlosem Gefäßwachstum und knäuelartigen Auftreibungen dar, wie auf Abbildung 47 (c) und (d) deutlich zu erkennen ist. Die Zubildungen können die Gestalt einer gefüllten Gefäßblase mit nur einem Hohlraum, oder eines Gefäßknäuels, welches aus mehreren, teilweise verbundenen Gefäßen besteht, annehmen. Die Isolectin-Endothelzellularfärbung lässt zwar keine eindeutigen Lücken oder Fenestrierungen in den Wänden der Tufts erkennen, die Analyse ist jedoch schwierig und eine Aussage über die Fenestrierung kann mittels dieser Färbung nicht eindeutig getroffen werden.



**Abbildung 47: Neovaskuläre Tufts**

(a), (b) Kleinere Tufts in Nachbarschaft zu großen Gefäßen (c), (d) Größere, knäuelartige Tufts am Übergangsbereich von vaskularisierter zu avaskulärer Netzhaut; grün: Isolectin B4

### **3.1.4.5.2. Unvollständige Vaskularisation der retinalen Peripherie**

Die Sauerstoffbehandlungen führen zu einem verzögerten Wachstum des tiefen retinalen Gefäßplexus. In Kombination mit diesem Phänomen kann es auch zu einer unvollständigen Vaskularisation der retinalen Peripherie durch mangelhafte Ausbildung des superfiziellen Gefäßplexus kommen.

Derartige Beobachten können ausschließlich an P21 in A-L und C-L gemacht werden (Tabelle 22/ Abbildung 46). Die ungenügende Vaskularisierung äußert sich in einer reduzierten Entwicklung vor allem des Kapillarnetzwerks im periphersten Drittel der Netzhaut. Solche Gebiete können sich auf ca.  $\frac{1}{4}$  der Retina ausbreiten, betreffen jedoch nie den kompletten peripheren Bereich. Häufiger ist eine reduzierte Vaskularisierung auf nur ein bis zwei Netzhautvierteln zu beobachten. Die spärlich ausgebildeten großen Arterien, Arteriolen und Venen sind in solchen Bereichen zwar vorhanden, weisen jedoch eine pathologische Morphologie mit Dilatation, Vasokonstriktion oder Tortuositas auf. Das feine Kapillarsystem dagegen ist entweder mangelhaft oder überhaupt nicht ausgebildet, sodass die Netzhaut flächenweise teils avaskulär vorliegt (Abbildung 48 (a)).

### **3.1.4.5.3. Arterio – venöses Crossing**

Vor allem an P11 tritt in bestimmten Gruppen ein Phänomen auf, welches als arterio-venöses Crossing bezeichnet wird [37]. Damit ist das gegenseitige Überwachsen von Gefäßen des superfiziellen Plexus gemeint, also z.B. AV-Crossing (Arterie über Vene), VA-Crossing (Vene über Arterie) oder das Wachsen von Kapillaren über große Venen oder Arterien.

Bei den untersuchten Netzhäuten werden solche Crossings hauptsächlich an P11 (A-L, A-R, C-L und C-R) gefunden. An P21 weist dagegen nur eine Netzhaut aus der Gruppe C-R die beschriebene Malformation auf (Abbildung 46). Die Lokalisation der Crossings lässt sich dabei nicht auf einen bestimmten Bereich der Retina festlegen, sie werden im gesamten vaskularisierten Netzhautbereich gefunden. Bei den aufgezählten Malformationen handelt es sich ausschließlich VA-Crossings, also das

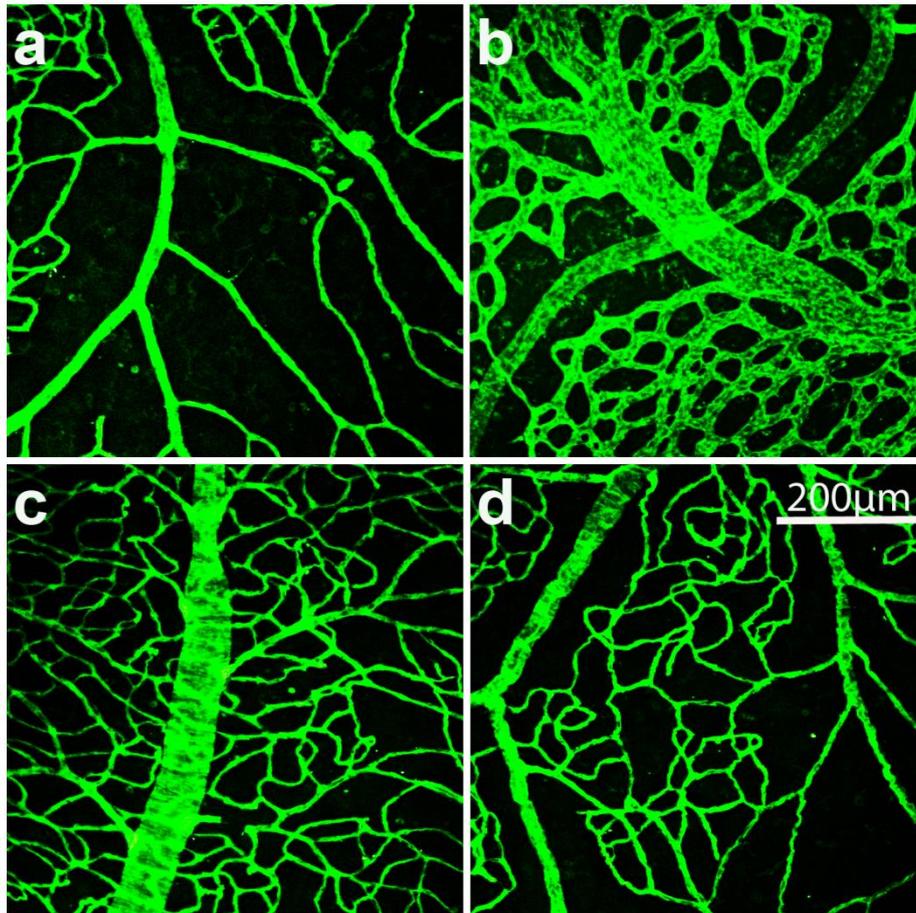
Überwachsen einer großen Vene über eine große Arterie (siehe Abbildung 48 (b)). AV-Crossings werden nicht gefunden.

#### **3.1.4.5.4. Vasokonstriktion und Dilatation**

Laut Abbildung 46 finden sich Vasokonstriktionen (und Dilatationen) der großen Gefäße in 3 von 58 untersuchten Augen (in A-L und C-L). Bei den Vasokonstriktionen handelt es sich lokale Einschnürungen großer Arterien und Venen. Die Vasokonstriktionen finden nicht auf längeren Gefäßstrecken statt, sondern es handelt sich vornehmlich um lokale Gefäßeinschnürungen, die oft gleichzeitig vom kapillaren Gefäßsystem des oberflächlichen Plexus überwachsen werden (Abbildung 48 (c)).

#### **3.1.4.5.5. Tortuositas**

In drei von 58 Versuchsaugen konnte eine vermehrte Gefäßschlängelung festgestellt werden (Abbildung 46). Betroffen ist davon ausschließlich A-L. Hier kommt es nicht zur klassischen, massiven Gefäßschlängelung (wie bei der menschlichen ROP), sondern zu einer nur in hohen Vergrößerungen erkennbaren, gestörten Gefäßwandbildung, welche zahlreiche Höcker und Dellen aufweist. Im Falle der kleineren Gefäße führt dies zu einer Mikroschlängelung, die Gefäße erwecken den Eindruck als würden sie zittern (siehe Abbildung 48 (d)).



**Abbildung 48: Lokale Gefäßpathologien**  
**(a)** Unvollständige Vaskularisation der retinalen Peripherie **(b)** Arterio-venöses Crossing **(c)** Vasokonstriktion **(d)** Tortuositas; grün: Isolectin B4

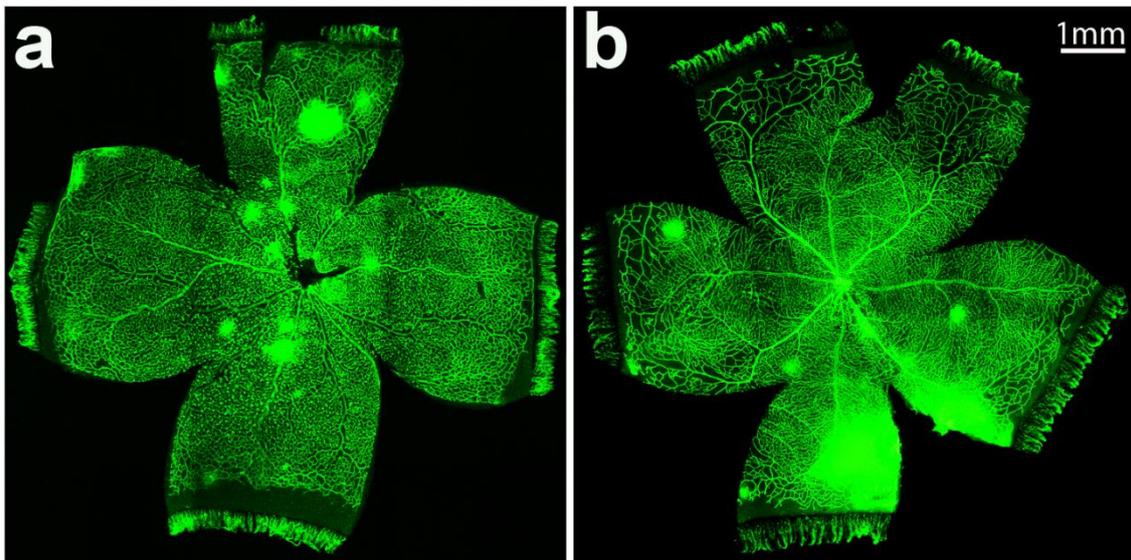
#### 3.1.4.5.6. Extravasate

Isolectin B4-Ansammlungen können an P11 in A-R und C-R und an P21 in A-L, A-R und in C-L (insgesamt sechs von 60 untersuchten Netzhäuten, siehe Tabelle 22/Abbildung 46) beobachtet werden.

Isolectin ist ein Endothelzellmarker und färbt außerdem auch Erythrozyten sowie retinale Mikroglia und Entzündungszellen an [148], weswegen es zur Detektion einer Blutung und/oder Entzündung geeignet ist, jedoch nicht dazwischen differenzieren kann. Das Vorhandensein eines retinalen Mikrohämatoms kann jedoch in allen vorliegenden Augen mit größeren Isolectin-Ansammlungen durch makroskopische Bestätigung des Augenpräparators verifiziert werden, Färbeartefakte oder

Entzündungen (ohne Blutaustritt) können in diesen Fällen ausgeschlossen werden. In einem Fall existieren auch *in vivo* Angiographie-Aufnahmen, auf welchen die Extravasationen zu erkennen sind (siehe 3.1.2.).

Extravasate stellen sich im gefärbten *flatmount*-Präparat als kreisrunde Ansammlungen grün fluoreszierenden Farbstoffs dar, welche unterschiedlich groß sein können (siehe Abbildung 49). Die extravasalen Ansammlungen von Blutbestandteilen treten teils multifokal über die gesamte Netzhaut verteilt oder auch einzeln auf, in einigen Augen kann auch eine Assoziation mit neovaskulären Tufts beobachtet werden. Die genaue Lokalisation der Extravasation in der Netzhaut ist mittels der *flatmount*-Analyse nicht auszumachen. Sie treten an P21 häufiger auf als an P11, was auf einen eventuellen Zusammenhang zwischen *vascular leakage* und der Gefäßreifung (Perizyten!) schließen lässt.



**Abbildung 49: Extravasate**  
(a) P11 (b) P21; grün: Isolectin B4

Abschließend zum Kapitel der lokalen Gefäßpathologien kann man festhalten, dass Schädigungen oder Anomalien an P11 und P21 nahezu gleich häufig auftreten (Abbildung 46). Betroffen sind hierbei jedoch ausschließlich die Gruppen, in welchen eine OP-Intervention stattgefunden hat (Gruppe A und C) und hier besonders die linken Augen. Die meisten Pathologien treten in A-L auf, während in den Gruppen B und D keinerlei Gefäßanomalien gefunden werden können.

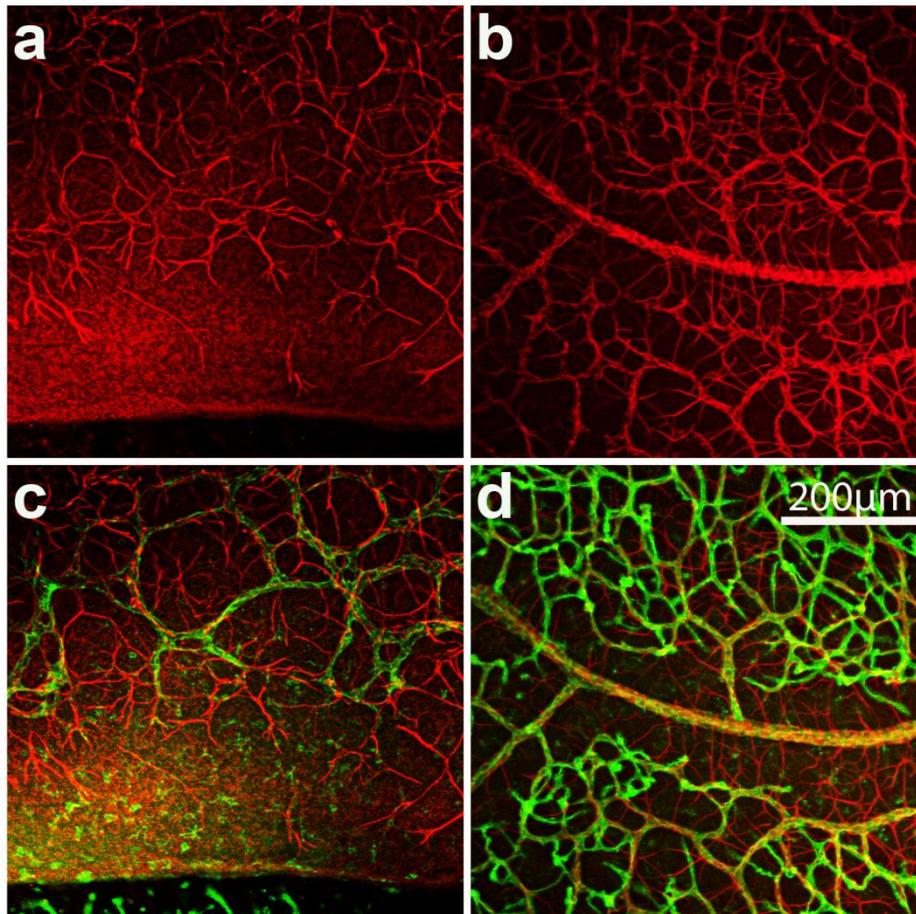
### 3.1.4.6. GFAP-Expression

Neben den Gefäßen werden auf den *flatmounts* auch die retinalen Astrozyten mittels einer GFAP-Färbung markiert und beurteilt. Aufgrund der starken PFA-Fixierung der Augen (2h bei RT) kommt es jedoch teilweise zur Maskierung der Gliazellenantigene [147], sodass diese sich meist nicht besonders gut anfärben und darstellen lassen. Einige grundlegende Aussagen über das Astrozytenwachstum in den Versuchsnetzhäuten können jedoch getroffen werden.

Wie bereits erwähnt, sind die morphologischen Veränderungen des retinalen Gefäßsystems in den Versuchsnetzhäuten in kleinen Mikroskopvergrößerungen nicht oder nur selten zu erkennen. Für die oben aufgezählten Analysen sind deshalb höhere Vergrößerungen und detailorientierte Quantifizierungsmethoden im Mikrometerbereich unerlässlich, dies gilt auch für die Untersuchung der Astrozyten.

Im Rahmen der eingeschränkten Darstellbarkeit der retinalen Astrozyten weisen diese in kleineren Vergrößerungen keinerlei abnormales Wachstum auf. Die Astrozyten sind gleichmäßig (außer in den Bereichen der lokalen Gefäßpathologien, siehe unten) über die Netzhaut verteilt und zeigen zumeist weder übermäßiges, noch verringertes bzw. verzögertes oder ausbleibendes Wachstum.

Die an P11 teilweise noch nicht vollständig ausgebildeten Gefäße orientieren sich in ihrem Wachstum an den darunterliegenden Astrozyten, dies lässt sich in Abbildung 50 (a) und (c) deutlich erkennen. In der Abbildung ist außerdem gezeigt, dass sich dabei nur der oberflächliche Gefäßplexus an den Astrozyten orientiert, während sich die tiefer liegende Gefäßschicht unabhängig davon ausbreitet. Auch im kapillarfreien Bereich in direkter Nachbarschaft zu großen Arterien (PGB) zeigen die Astrozyten unauffälliges Wachstum, es sind keinerlei Aussparungen oder anderweitige Pathologien erkennbar (Abbildung 50 (b) und (d)).



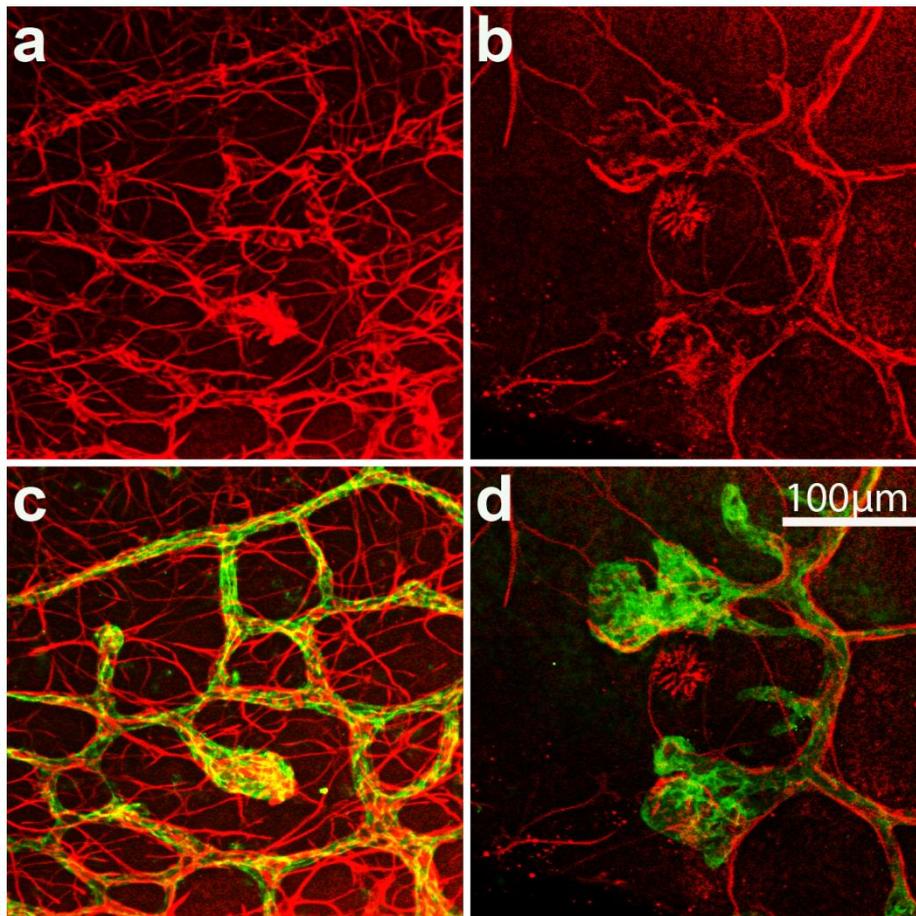
**Abbildung 50: GFAP-Expression und Gefäßwachstum**

(a) Physiologisches Wachstum retinaler Astrozyten in retinaler Peripherie an P11 (c) Retinale Astrozyten als Wachstumsschablone für retinale Gefäße (b) Physiologisches Wachstum retinaler Astrozyten im periarteriell gefäßfreien Bereich (d) Periarteriell gefäßfreie Bereiche; grün: Isolectin B4, rot: GFAP

In den Bereichen der lokalen Gefäßpathologien wird das Astrozytenwachstum besonders detailliert untersucht. In Bezug auf die kleineren neovaskulären Tufts in Nachbarschaft zu großen Gefäßen, lassen sich dabei im Astrozytennetzwerk nur minimale Veränderungen beobachten. Teilweise formen die unter den Tufts liegenden Astrozyten ebenfalls kleine, rundliche Strukturen, die GFAP-Expression in diesen Knäueln ist dabei leicht erhöht. Diese Veränderungen sind allerdings von geringem Ausmaß (Abbildung 51 (a) und (c)). Im Bereich der größeren, im vaskulären Übergangsbereich liegenden Tufts zeigt sich ein anderes Bild. Die Gliazellen sind unter den Tufts nur spärlich vorhanden, in manchen Fällen fehlen sie gänzlich. Hier fällt weiterhin auf, dass das Astrozytennetzwerk auch in die noch nicht vaskularisierten Randbereiche hinein ausgedünnt bzw. gar nicht vorhanden ist. Ein

physiologisches Gefäßwachstum in diesen Arealen ist somit nicht möglich (Abbildung 51 (b) und (d)).

In den Bereichen der übrigen lokalen Gefäßpathologien sind Abweichungen in der GFAP-Expression entweder nicht zu beobachten oder (aufgrund der Färbung) nicht zu beurteilen.



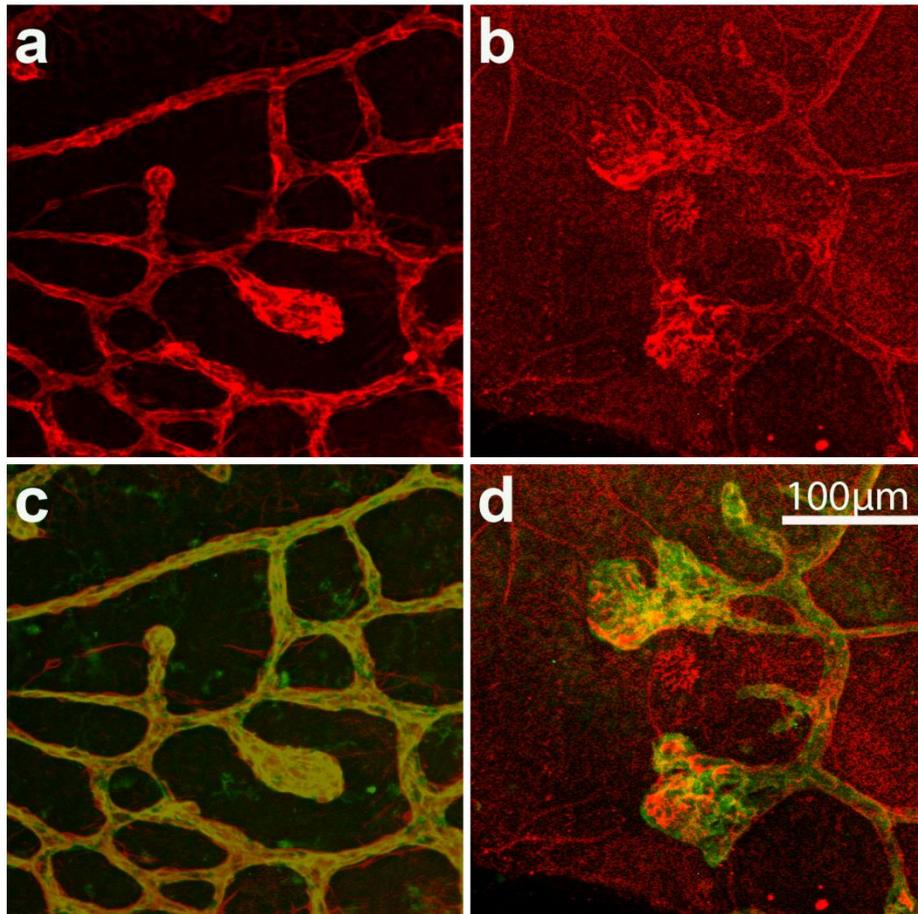
**Abbildung 51: GFAP-Expression im Bereich neovaskulärer Tufts**  
(a), (c) Minimal erhöhte GFAP-Expression im Bereich kleinerer Gefäßaufreibungen (b), (d) Erhöhte GFAP-Expression im Bereich größerer Tufts sowie auch stark reduziertes Astrozytenwachstum in der näheren Umgebung dieser Tufts; grün: Isolectin B4, rot: GFAP

#### **3.1.4.7. Ng2-Expression**

Die Retinae werden routinemäßig für eine Dreifachfärbung neben Isolectin B4 und GFAP auch mit Ng2 markiert, dieser Antikörper ermöglicht die Darstellung retinaler Perizyten. Ähnlich der GFAP-Färbung gestaltet sich dies jedoch durch die starke PFA-Fixierung der Netzhäute schwierig und gelingt nur teilweise lokal.

Untersucht werden sämtliche Versuchsnetzhäute. Dabei kann festgestellt werden, dass korrelierend zu den morphologisch geringen Gefäßveränderungen auch die Ummantelung der Gefäße weitestgehend ohne nennenswerte Auffälligkeiten abläuft. Auch die Differenzierung der Gefäße zu großen Arterien und Venen und Kapillaren, welche im Rahmen der Perizyten-Rekrutierung stattfindet, läuft physiologisch ab.

Erwähnenswert ist die Ng2-Expression in den Bereichen der neovaskulären Tufts. In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Zubildungen ebenfalls von Ng2 ummantelt sind [83], diese Beobachtung gilt auch für die vorliegende Arbeit. Die kleineren, blasenartigen Tufts sind vollständig von Perizyten umgeben und weisen eine intakte Struktur auf (Abbildung 52 (a) und (c)). Allerdings muss hier erneut auf die eingeschränkte Aussagekraft der Färbung hingewiesen werden, da die Perizyten-Ummantelung aufgrund technischer Probleme nicht bei allen Tufts nachgewiesen werden konnte. So konnte beispielsweise der Nachweis von Perizyten im Bereich von Tufts kombiniert mit Blutungen nicht gelingen und müsste erneut untersucht werden, um eine Aussage diesbezüglich treffen zu können.



**Abbildung 52: Ng2-Expression im Bereich neovaskulärer Tufts**  
**(a), (b)** Vollständige Ummantelung kleinerer neovaskulärer Zubildungen mit Perizyten **(b), (d)** In Bereichen größerer Tufts ist eine Perizyten-Ummantelung wahrscheinlich, jedoch nicht eindeutig nachzuweisen; grün: Isolectin B4, rot: Ng2

### 3.2. Genexpressionsanalyse

In der vorliegenden Arbeit wird die Expression folgender Gene untersucht: HIF1 $\alpha$ , VEGF-A164, EPO-Rezeptor (EpoR), TNF $\alpha$  und NOS-2, die Funktion und Bedeutung dieser Gene für die Angiogenese und für die ROP wurden bereits erklärt. In den Abbildungen 54 bis 58 sind die Ergebnisse für alle fünf untersuchten Gene in A-L, A-R, B, C-L und C-R zusammengefasst. Die y-Achse stellt hier auf der Höhe eines *fold change* von 1 die sog. Baseline dar, die mithilfe des Referenzgens HPRT und der Kontrollgruppe errechnet wurde und das physiologische Expressionslevel angibt. Abweichungen von der Baseline werden an P7, P11 und P21 untersucht und im zeitlichen Verlauf von links nach rechts dargestellt.

Bei dem für die Genexpressionsanalyse verwendeten *housekeeping gene* handelt es sich um die sog. Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT). Dieses Gen wird besonders unter hyperoxischen Bedingungen konstant exprimiert [154] und eignet sich somit hervorragend als Referenzgen zur Berechnung der Herauf- bzw. Herunterregulation der zu untersuchenden Gene im vorliegenden Versuch.

Die Werte von P7, P11 und P21 jeweils eines Gens werden mit dem Einweg-ANOVA-Test auf Signifikanz zueinander überprüft, die signifikanten Unterschiede sind jeweils mit einem \* markiert.

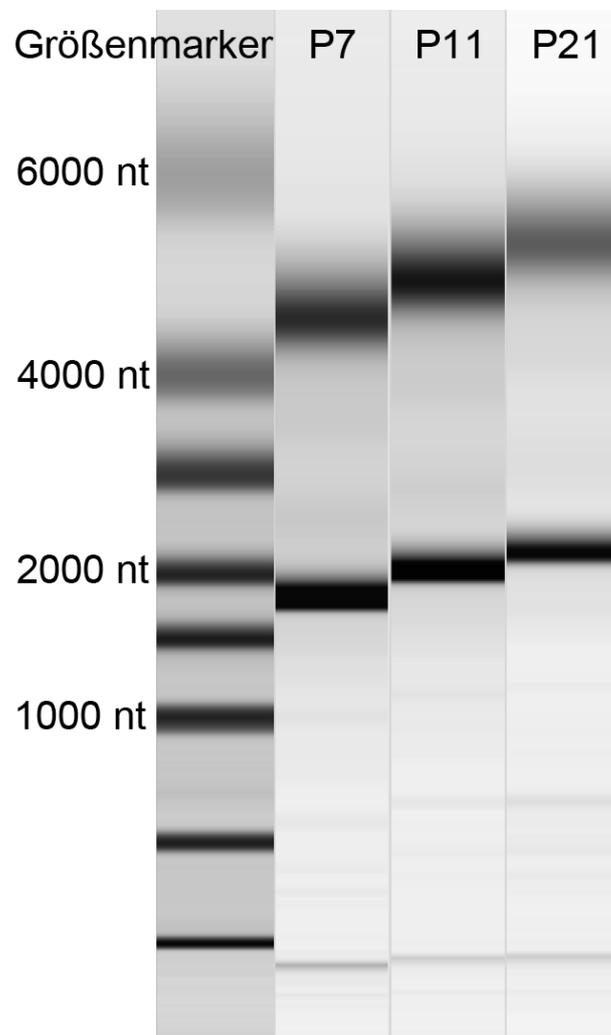
#### 3.2.1. RNA-Qualität

Für die Qualität und Aussagekraft der Genexpressionsanalysen ist qualitativ hochwertiges Ausgangsmaterial unbedingt erforderlich. Minderwertige, kontaminierte oder degradierte RNA führt zu falschen oder gar keinen Ergebnissen in der quantitativen PCR.

Die technische Durchführung und das Prinzip der RNA-Qualitätskontrolle ist in 2.3.2.2.1.2. erklärt.

In Abbildung 53 ist die RNA-Qualitätskontrolle für Proben von P7, P11 und P21 abgebildet, diese Abbildung soll beispielhaft für alle durchgeführten Versuche und RNA-Proben gelten. Die beiden Banden stellen die 18S- (1800 Nukleotide) sowie die 28S- (5000 Nukleotide) Untereinheiten der RNA dar, welche aufgrund ihrer Größe gut voneinander unterschieden werden können. Deutlich ist an der Intensität und

Dicke der beiden Banden zu erkennen, dass an P7 höhere RNA-Gehalte erzielt werden können als an P21. Weiterhin steigern sich die beiden RNA-Komplexe zwischen P7 und P21 in ihrer Größe. Viel wichtiger ist jedoch die Qualität der jeweiligen RNA. Unabhängig von der Menge an RNA zeigen sämtliche Proben eine deutliche Abgrenzung der beiden Banden und keine ganzheitliche Verteilung der RNA auf die gesamte Gelstrecke, was auf eine qualitativ hochwertige und intakte RNA hinweist. Mit dieser Voraussetzung kann im Weiteren auch sichere und effiziente quantitative PCR durchgeführt werden.



**Abbildung 53: Nachweis der RNA-Qualität**  
Kapillargelelektrophoresebilder der 18S- sowie 28S-Komplexe an P7, P11 und P21

### 3.2.2. HIF1 $\alpha$

Die Expression von HIF1 $\alpha$  ist in allen Gruppen an allen Untersuchungstagen nur minimal verändert und kann hier vernachlässigt werden (Zahlenwerte siehe Tabelle 35 im Anhang) (Abbildung 54).

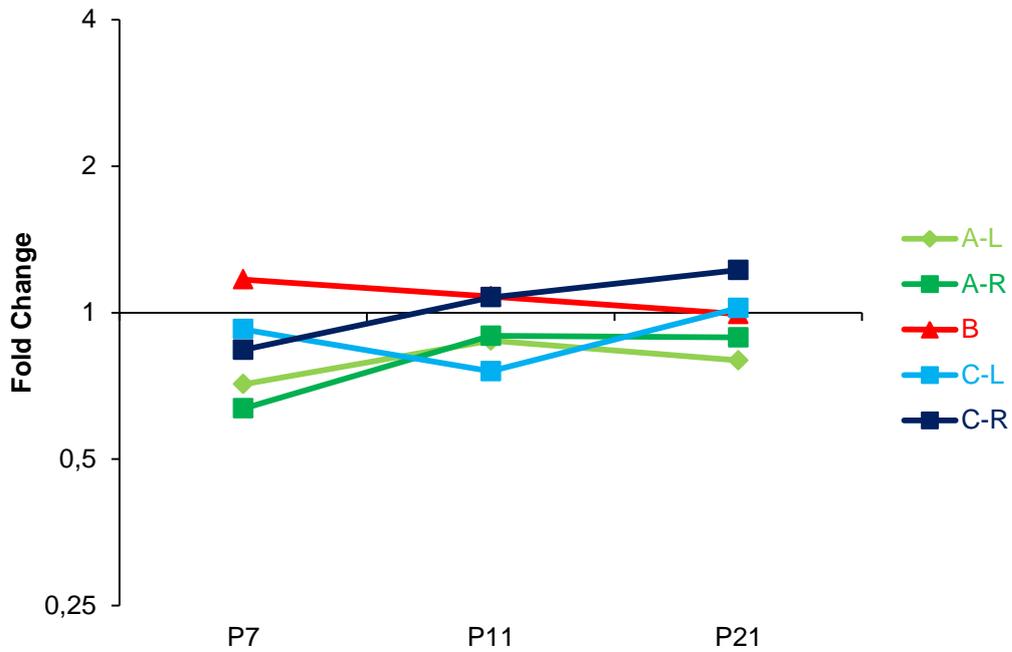


Abbildung 54: Expressionslevel von HIF1 $\alpha$

### 3.2.3. VEGF-A 164

Die Expression von VEGF liegt in Gruppe A zu keinem Untersuchungszeitpunkt maßgeblich verändert vor.

Interessanter ist dagegen das Expressionsmuster in allen Gruppen, welche an P6 der 24-stündigen, 80%igen Hyperoxie ausgesetzt waren. Die Sauerstoffübersättigung führt in allen Augen zu einer Herabregulation von VEGF-A an P7.

In Gruppe B fällt die Herabregulation bis auf 0,37 besonders auf. Bis P11 steigt die Expression dann wieder auf das Niveau der Baseline an, an P21 ist sogar eine leichte Heraufregulation zu beobachten. Der Unterschied zwischen P7 und P11, sowie zwischen P7 und P21 ist dabei jeweils signifikant.

Für Gruppe C ergibt sich an P7 ebenfalls eine starke Herunterregulation in beiden Augen, welche jedoch in C-R deutlicher ausgeprägt ist (0,37). An P11 kommt es in C-L und C-R zu einem Anstieg in der Menge der VEGF-RNA, beide Augen bewegen sich aber auch jetzt noch im herabregulierten Bereich. An P21 steigt die Expression in C-L in etwa auf die Höhe der Baseline an, in C-R bleibt sie im Vergleich zu P11 in etwa gleich (Zahlenwerte in Tabelle 36 im Anhang) (Abbildung 55).

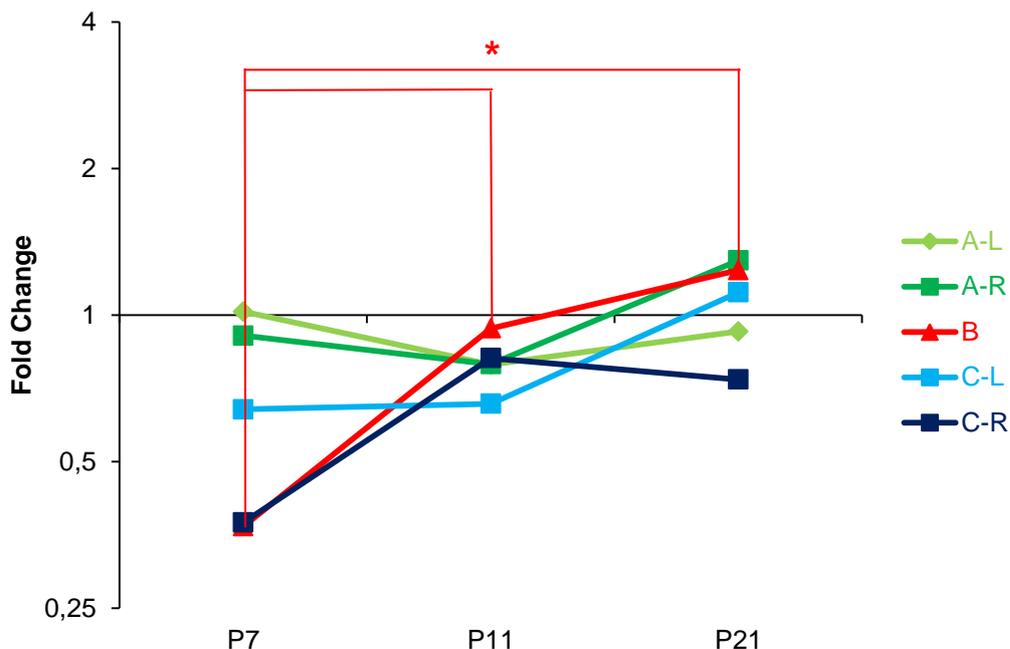


Abbildung 55: Expressionslevel von VEGF-A 164

\*p<0,05

### 3.2.4. EpoR

Für EpoR sind die Abweichungen von der „Nulllinie“, ähnlich wie für HIF1 $\alpha$ , äußerst gering und bewegen sich im physiologischen Schwankungsbereich der Genexpression (Zahlenwerte in Tabelle 37) (Abbildung 56).

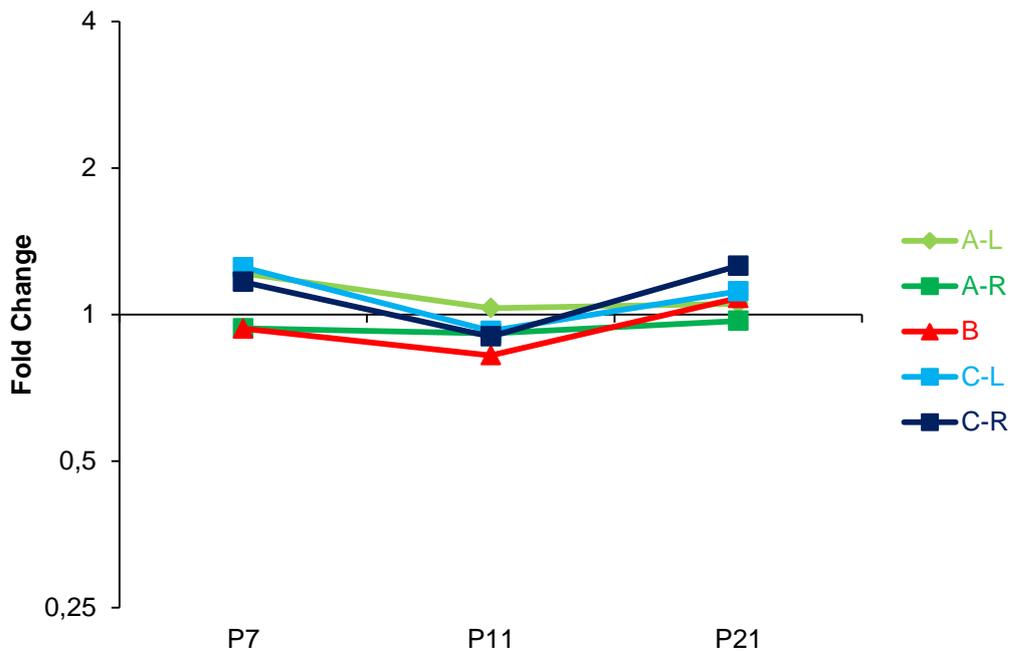


Abbildung 56: Expressionslevel von EpoR

### 3.2.5. TNF $\alpha$

Abgesehen von Gruppe B, ähnelt das Expressionsmuster von TNF $\alpha$  demjenigen von VEGF, Unterschiede bestehen jedoch in der Quantität der RNA.

Für A-L und A-R verändert sich die Expression zwischen P7 und P11 nicht, A-R bewegt sich damit auf dem Niveau der Baseline, während die *fold change* Werte für A-L in etwa bei 1,4 beträgt. Bis P21 steigt das Level für A-L auf 2,1, für A-R auf 1,7 an.

Die Veränderungen von C-L sind für TNF weniger ausgeprägt als für VEGF, an P21 kommt es jedoch zu einer Heraufregulation des Gens bis auf 1,2. Für C-R ist an P7 eine leichte Herabregulation, dann bis P11 ein Anstieg auf 1,3 und schließlich wieder ein Absinken zu beobachten (Zahlenwerte Tabelle 38) (Abbildung 57).

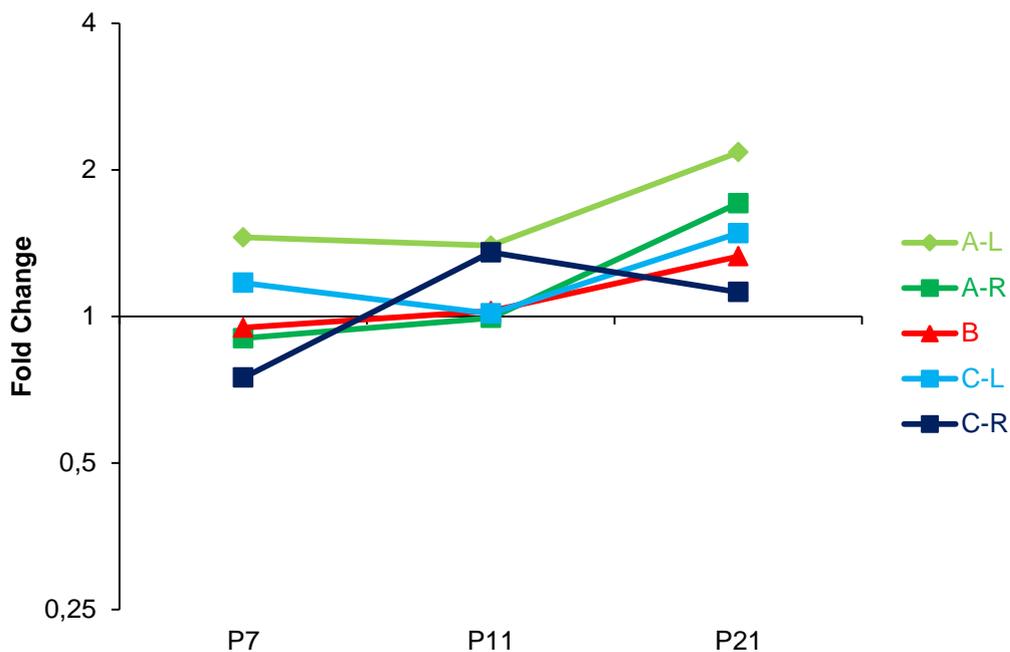


Abbildung 57: Expressionslevel von TNF $\alpha$

### 3.2.6. NOS-2

Für Gruppe A ergibt sich für die beiden Augen ein recht unterschiedliches Bild. In A-L kommt es an P7 zu einer Hochregulation bis 1,7, die dann im Laufe der Zeit abnimmt und bis zu P21 in eine Herabregulation dieses Gens übergeht. Der Unterschied zwischen P7 und P21 ist hierbei signifikant. Im A-R dagegen zeigen sich an P7 und P21 nur minimale Veränderungen für NOS-2, während an P11 eine deutliche Hochregulation auf 1,7 zu beobachten ist.

NOS-2 zeigt in Gruppe B an P7 eine leichte Herabregulation, die bis P11 in eine leichte Heraufregulation übergeht, an P21 bewegt sich die Genexpression in etwa auf physiologischem Niveau.

In C-L ist NOS-2 an P7 stark hochreguliert und sinkt dann bis P11 auf ein Expressionslevel unter der Baseline ab, zwischen P11 und P21 sind keine nennenswerten Expressionsunterschiede zu beobachten. Der Expressionsunterschied zwischen P7 und P21 ist jedoch signifikant. In C-R findet an P7 eine deutliche Herunterregulation von Nos2 bis auf 0,5 statt, die Expression steigt an P11 und P21 in etwa auf das Level im linken Auge an, sodass sich Unterschiede zwischen den beiden Augen nur an P7 ergeben (Zahlenwerte in Tabelle 39) (Abbildung 58).

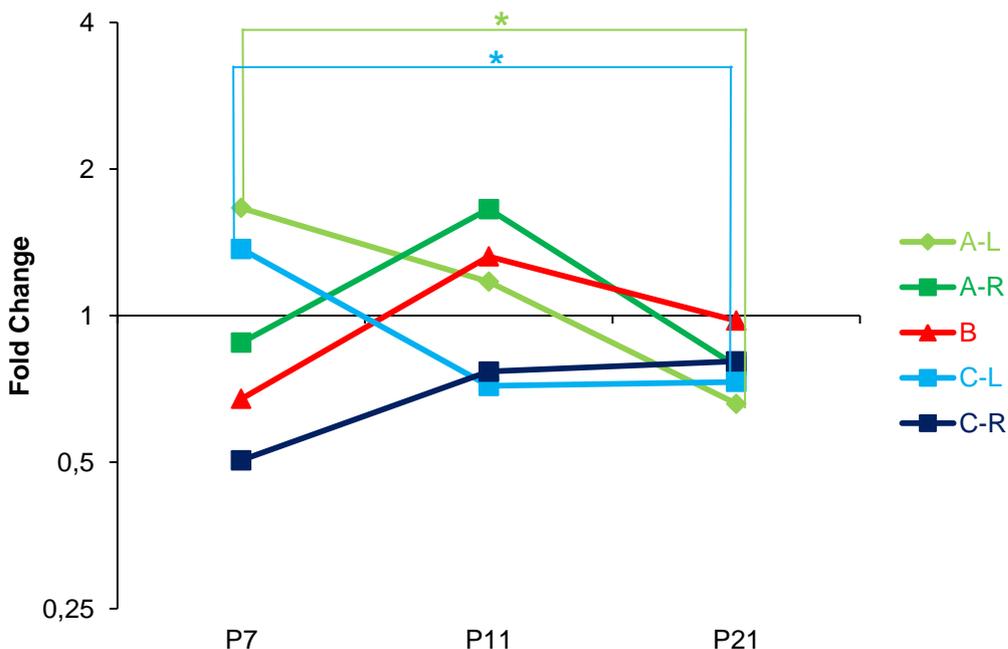


Abbildung 58: Expressionslevel von NOS-2

\*p<0,05

Zusammenfassend können die Veränderungen in der Genexpression als relativ gering beschrieben werden. Das Expressionsmuster für HIF1 $\alpha$  ist in allen Gruppen kaum verändert. Für VEGF-A164 lassen sich insgesamt deutlichere Veränderungen erkennen, wobei hier Ähnlichkeiten (die starke Herabregulation an P7) zwischen den Gruppen B und C zu beobachten sind. Die Veränderungen von EpoR sind ebenfalls unauffällig und entsprechen in allen Gruppen stets einer leichten Heraufregulation an P7, gefolgt von einer Herabregulation an P11 und dann wieder einer Heraufregulation an P21. Für TNF $\alpha$  ist das Expressionsmuster in allen Gruppen ähnlich, wenn auch nicht besonders auffällig. In den linken Augen der Gruppen A und C sowie in Gruppe B sind zwischen P7 und P11 keine großen Unterschiede erkennbar, an P21 kommt es dann zu einer etwas stärkeren Heraufregulation des Gens. Diese Veränderungen sind in A-L am stärksten ausgeprägt, gefolgt von C-L und B. Für NOS-2 sind Ähnlichkeiten vor allem für die linken Augen der Gruppen A und C zu beobachten, hier ist jeweils eine starke Heraufregulation an P7, gefolgt von Herabregulation über P11 und P21 zu beobachten. Das Expressionsmuster von NOS-2 in Gruppe B entspricht eher dem der rechten Augen aus Gruppe A (und C).

## 4. Diskussion

### 4.1. Interpretation morphologischer Veränderungen des retinalen Gefäßsystems im PVL-Rattenmodell

#### 4.1.1. Leichte Veränderung des retinalen Gefäßsystems von A-R, B und C-R

Im Rahmen des PVL-Rattenmodells werden durch verschiedene Kombinationen von Ischämie, Hypoxie und Hyperoxie vier verschiedene Versuchsgruppen geschaffen. Zusätzlich zur Ischämie werden die Tiere der Gruppe A noch einer einstündigen, 6%igen Hypoxie ausgesetzt, die Tiere der Gruppe C erhalten ebenfalls eine Stunde lang 6% Sauerstoff und werden anschließend für 24 Stunden in 80%ige Hyperoxie verbracht. Die Tiere der Gruppe B werden ohne OP für 24 Stunden der 80%igen Hyperoxie ausgesetzt, während die Tiere der Gruppe D in Normoxie verbleiben und als Kontrolltiere dienen. Die Ischämie wird dabei durch unilaterale Ligatur der Arteria carotis communis (ACC) am Lebenstag sechs hervorgerufen, welche über die Arteria carotis interna, die Arteria ophthalmica und somit auch die Arteria retinalis centralis mit Blut versorgt [5]. Durch die permanente Unterbrechung der Blutzufuhr kommt es in der linken Netzhaut zu einer Minderdurchblutung, die rechte Netzhaut ist davon nicht oder nur geringfügig betroffen (siehe unten).

Für das rechte Auge, als kontralaterale Seite zur UCL, ergibt sich in den Gruppen A und C sowie für beide Augen der Gruppe B ein ähnlich mildes Bild der retinalen Gefäßveränderung. Bezüglich der Entwicklung des tiefen Gefäßplexus ist diese sowohl an P11 als auch an P21 nicht nennenswert zur Kontrollgruppe verändert. Um eine auffällige Verzögerung dieser Entwicklung hervorzurufen, reicht die Schwere bzw. die Dauer des Insults hier offensichtlich nicht aus.

Bezüglich des arteriellen Gefäßdurchmessers lassen sich vor allem in A-R und C-R vergrößerte GD, speziell in der zentralen Netzhaut beobachten. Die im Rahmen des *vascular remodeling* physiologisch stattfindende Reduktion des GD [6] [33] unterbleibt in diesen Augen zwischen P11 und P21 oder läuft stark verzögert ab. Um jedoch zu klären, ob die letztendliche Gefäßmaturation hier vollkommen ausbleibt oder verzögert abläuft, wäre ein länger als 21 Tage dauernder Versuchsaufbau nötig.

Außerdem ist die räumliche Entwicklung des arteriellen GD in A-R und C-R verzögert bzw. kann ein Ausbleiben der Gefäßreifung beobachtet werden: Das in der Kontrollgruppe (und Gruppe B) sichtbare Angleichen zentraler und mitt-peripherer GD an P21 bleibt in diesen beiden Gruppen aus. Stattdessen ist an P21 immer noch zentral ein größerer Arterien Durchmesser als mitt-peripher vorhanden. Dieses Verhältnis spiegelt wohl eher die physiologische Situation an P11 wieder, sodass diese Augen womöglich eine um mindestens zehn Tage verzögerte Gefäßreifung aufweisen.

Bei der Untersuchung der periarteriell gefäßfreien Bereiche (PGB) und der *branching points* (BP) als Indikatoren für die Gefäßreifung tritt Gruppe B mehr in den Vordergrund. Die PGB geben Aufschluss über den aktuellen Stand der retinalen Gefäßreifung und die Sauerstoffversorgung der Netzhaut. Diese Bereiche sind in Gruppe B deutlich signifikant verbreitert und weisen damit von allen Gruppen die stärkste Abweichung von der Norm auf. Für C-R ist ebenfalls eine Verbreiterung der PGB zu verzeichnen, während A-R nur unwesentlich von den PGB-Werten der Kontrollgruppe abweicht. Da Gruppe B (im Gegensatz zu Gruppe A und C) keine OP-Intervention erhalten hat, macht sich die erhöhte Sauerstoffkonzentration vor allem hier bemerkbar und führt zu einem erhöhten Sauerstofftransport durch die retinalen Blutgefäße. Es kommt zur verstärkten Diffusion von Sauerstoff aus den großen Arterien ins umliegende Gewebe, was eine Verbreiterung der PGB zur Folge hat. Wie verschiedene Arbeitsgruppen bereits zeigen konnten, ist dieser Effekt auf eine (Hyperoxie-bedingte) verminderte VEGF-Ausschüttung in der Nachbarschaft großer Arterien zurückzuführen, was entweder ausbleibende Endothelzell-Rekrutierung oder Absterben bereits vorhandener Endothelzellen zur Folge hat [37] [40]. Für C-R lässt sich eine weniger prominente Verbreiterung der PGB verzeichnen. Zwar wurde diese Gruppe ebenfalls einer 24-stündigen Hyperoxie ausgesetzt, jedoch fand hier im Vorfeld zusätzlich die UCL auf der linken Körperseite statt und die Tiere wurden danach für eine Stunde in 6%ige Hypoxie verbracht. Möglicherweise kompensieren sich diese beiden Interventionen in Bezug auf die Breite der PGB gegenseitig, deshalb machen sich die entsprechenden Effekte in C-R weniger stark bemerkbar. Bestätigt werden könnte diese Hypothese durch die kaum vorhandene Änderung der PGB in A-R. Diese Gruppe hat keine Hyperoxie erhalten, weshalb eine Verbreiterung der PGB ausbleibt. Für eine Verschmälerung der PGB (wie bei A-L) reicht jedoch der

Ischämie-Insult der kontralateralen UCL und die nur einstündige Hypoxie hier scheinbar nicht aus.

Auch bezüglich der Anzahl der *branching points* ist in A-R kaum eine Abweichung von der Kontrolle nachzuweisen. Für Gruppe B, aber auch für C-R ist die Anzahl der BP dagegen signifikant erhöht. Unter *branching points* versteht man die kapillären Verschaltungen einer (vornehmlich der superfiziellen) Gefäßschicht untereinander. Durch die Bestimmung ihrer Anzahl lässt sich der Reifegrad eines Gefäßsystems bestimmen [32] [45] [44], da sie durch Umbau- und Apoptosevorgänge im Rahmen des *vascular remodeling* zahlenmäßig dezimiert werden. Die hohe Anzahl an BP in B und C-R deutet demnach auf ein unreifes Gefäßsystem hin, während bei der BP-Analyse der Kontrollgruppe deutlich weniger BP gezählt werden. Vermutlich führt auch hier die Hyperoxie allein bzw. die Kombination aus Hypoxie/Ischämie und Hyperoxie zu einer stärkeren Verzögerung der Gefäßreifung als die Hypoxie/Ischämie allein. Diese Aussage gilt jedoch ausschließlich für die zur UCL kontralaterale, rechte Seite, da sich der Ischämie-Schaden in dem zur UCL ipsilateralen Auge sehr viel stärker auswirkt.

Betrachtet man abschließend die Verteilung lokaler Gefäßpathologien in A-R, B und C-R, so sind diese vornehmlich in A-R zu finden, wobei diese Veränderungen von geringem Ausmaß sind. In C-R ist die Ausprägung der Gefäßpathologien noch stärker abgeschwächt, während in Gruppe B nahezu keine Pathologien zu beobachten sind.

Die geringgradigen Veränderungen in A-R und C-R zeigen, dass sich die linksseitige Ischämie auf das kontralaterale Auge kaum auswirkt, eine Tatsache, die für Ischämie-bedingte Hirnschäden bereits bekannt ist. Hier konnte gezeigt werden, dass sowohl transiente als auch permanente ACC-Okklusion nur zum Absterben von Nervenzellen in der ipsilateralen Hemisphäre führt [156]. Diese Hypothese kann für das Auge durch die gefundenen Ergebnisse bestätigt werden: Das rechte Auge der Hypoxie/Ischämie-Gruppe zeigt meist die geringste Schädigung unter den untersuchten Gruppen. Die 6%ige Hypoxie führt hier möglicherweise über eine kurzzeitig erhöhte VEGF-Ausschüttung zu einer Störung des empfindlichen Wachstumsfaktorengleichgewichts in der Netzhaut, was wiederum eine Störung bzw. Verzögerung der Gefäßreifung zur Folge haben könnte. In C-R führt die zusätzliche Hyperoxie zu einer kleinen Steigerung des Schädigungsmusters im

Vergleich zu A-R, welche ebenfalls durch geringgradige Störungen in der VEGF-Expression bedingt sein kann. Dies zeigt sich auch in den Ergebnissen der quantitativen PCR, die Herabregulation von VEGF an P7 betrifft C-R sehr viel stärker als A-R. Bezüglich Gruppe B sind fast ausschließlich Veränderungen in Bezug auf die Gefäßreifung zu finden, Gefäßpathologien fallen in dieser Gruppe nicht auf. Die VEGF-Herabregulation an P7 ist auch hier zu beobachten und ist vermutlich auf die 80%ige Sauerstoffzufuhr zurückzuführen. Die Normalisierung des Expressionslevels über die folgende Zeit schließt sich zwar an, jedoch wurde das Gefäßwachstum bzw. die Gefäßreifung in einer entscheidenden und äußerst sensiblen Phase gestört, was die oben genannten Effekte zur Folge hat.

Sirinyan et al. publizierten 2006 eine Studie über die Effekte länger (sechs Tage) andauernder Hyperoxie auf das Mikrogefäßsystem des neonatalen Rattengehirns. Ein degenerativer Effekt der Hyperoxie auf die Endothelzellen von Kapillargefäßen konnte hier eindeutig nachgewiesen werden und wurde auf eine Heraufregulation und übermäßige Produktion von NOS-3 (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase) zurückgeführt [157]. In Gruppe B der vorliegenden Arbeit kommt es (an P11) zu einer Heraufregulation von NOS-2 (induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase). Die Hyperoxie führt hier vermutlich zu einer beginnenden Endothelzelldegeneration, welche sich offensichtlich durch die (vergleichsweise) kurze Dauer des Insults jedoch nicht schwerwiegend manifestieren kann.

#### **4.1.2. Mäßige Veränderung des retinalen Gefäßsystems von A-L und C-L**

Speziell in den zur UCL ipsilateralen Augen zeigt sich, dass die Kombination, zeitliche Dauer und Abfolge der Sauerstoffbehandlung im PVL-Rattenmodell zu einem Schädigungsmuster des retinalen Gefäßsystems führt, das sich deutlich von dem der übrigen ROP-Modelle abgrenzt. Aus der vorliegenden Arbeit geht dabei eindeutig hervor, dass die linken Augen der Tiere mit OP-Intervention (A-L und C-L) sowohl an P11 als auch an P21 den größten Schaden im Rahmen der untersuchten Gruppen aufweisen.

In diesen Augen ist die Ausdehnung des tiefen Gefäßplexus messbar verzögert, wobei der Schaden in A-L und C-L annähernd gleich groß ist. Die durch die UCL

bedingte Ischämie ruft in Kombination mit der 6%igen Hypoxie eine Verzögerung im Gefäßwachstum hervor. Wie Ogishima et al. 2011 zeigen konnten, kommt es kurz nach Verschluss der ACC zu einer vollständig ausbleibenden Durchblutung der entsprechenden Netzhaut. Die Durchblutung kehrt einige Zeit nach dem Insult mehr oder weniger stark zurück, erreicht jedoch nicht mehr das Level der Kontrollgruppe [3]. Diese temporär totale und konsekutiv partielle Ischämie, kombiniert mit der sich anschließenden Hypoxie führt zur Schädigung und zum Absterben retinaler Endothelzellen. Bedingt dadurch kommt es zur Störung des Gefäßwachstums und somit zu einer Verzögerung der Ausbreitung des tiefen Gefäßplexus. Die nachfolgende Hyperoxie scheint hier für die Verzögerung der Plexusausbreitung eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Betrachtet man den arteriellen GD von A-L und C-L, so fallen vor allem an P21 massive und signifikante Erhöhungen in der zentralen Netzhaut auf. Im Rahmen einer physiologischen Gefäßentwicklung zwischen P11 und P21 ist weiterhin eine Reduktion des zentralen arteriellen GD zu erwarten. In A-L und C-L jedoch findet anstatt einer Reduktion eine Erhöhung des GD zwischen den beiden Zeitpunkten statt, was einen möglichen Hinweis auf verzögerte bzw. gestörte Gefäßreifung darstellt. Im Rahmen des *vascular remodeling* kommt es unter anderem auch zu einer Abnahme des GD, welche durch Apoptose- und Migrationsvorgänge vermittelt wird [33]. Dieser Mechanismus scheint vor allem in den Augen mit OP-Intervention deutlich gestört zu sein, da es hier anstatt zu einer Abnahme, zu einer Zunahme des GD kommt. Die gestörte Gefäßmaturation macht sich dabei in C-L sogar noch stärker bemerkbar als in A-L.

Die ohnehin durch Ischämie und Hypoxie angegriffenen Gefäßwände werden nun wahrscheinlich durch Hyperoxie-bedingte Sauerstoffradikale zusätzlich geschädigt, sodass die physiologische Gefäßreifung vermutlich geshört wird. Dies geht so weit, dass nicht nur die Reduktion des GD ausbleibt, sondern es im Gegenteil noch zu einer Verbreiterung der GD zwischen P11 und P21 kommt. Zusätzlich belastend kommt für die unreifen Gefäße hinzu, dass diese nicht angemessen auf äußere Einflüsse wie Hyperoxie reagieren können. Ihnen fehlt die Fähigkeit zur Autoregulation. Hyperoxie-bedingte Vasokonstriktion im Sinne einer verminderten Sauerstoffdiffusion ins umliegende Gewebe ist hier deshalb nicht möglich. Weiterhin besitzen unreife bzw. neugeborene Organismen ungenügende Mengen antioxidativ wirksamer Substanzen. Sie sind somit empfindlicher gegenüber Sauerstoff- und

Stickstoffradikalen, welche vor allem die Endothelzellen kleiner und unreifer Gefäße angreifen und schädigen [157] [158].

Bezüglich der räumlichen Entwicklung des arteriellen GD fällt ebenfalls eine deutliche Verzögerung der Gefäßentwicklung vor allem in A-L und C-L auf. An P11 ist in diesen beiden Gruppen die physiologische Abnahme des arteriellen GD zwischen zentraler und mitt-peripherer Netzhaut deutlich abgeschwächt. Die Welle der Gefäßreifung „rollt“ zu diesem Zeitpunkt von zentral nach peripher und führt vor allem in der retinalen Peripherie zu massiven Umbauvorgängen. Diese Veränderungen bleiben in den linken Augen der Gruppen A und C an P11 aus, sodass hier im Gegensatz zur Normoxie-Gruppe keine signifikante Reduktion des arteriellen GD zu verzeichnen ist.

An P21 sind die Reifungsvorgänge im Endstadium und in der Kontrollgruppe (sowie auch in Gruppe B) schon fast abgeschlossen, was sich zu diesem Lebenszeitpunkt in einer Angleichung der zentralen und mitt-peripheren arteriellen GD äußert. In A-L und C-L jedoch findet sich nun erst die (eigentlich schon an P11 stattfindende) Reduktion des GD zwischen zentraler und mitt-peripherer Netzhaut. Die Gefäßreifung ist hier möglicherweise um mindestens zehn Tage verzögert.

Bei der Analyse der PGB in A-L lässt sich eine signifikante Reduktion der PGB messen. Bedingt durch die Ischämie und die darauffolgende Hypoxie wird weniger Sauerstoff durch die retinalen Arterien befördert, was zu einer abgeschwächten Diffusion von Sauerstoff in die direkte Nachbarschaft der Arterien führt. Dadurch verkleinern sich die periarteriell gefäßfreien Bereiche und geben somit Hinweise auf Sauerstoffunterversorgung und verzögerte Gefäßreifung [36]. Es fällt weiterhin auf, dass die PGB in C-L nahezu den Werten der Kontrollgruppe entsprechen und kaum Veränderungen aufweisen. Die Kombination aus Hypoxie/Ischämie und Hyperoxie scheint hier zu einer Milderung der Pathologie zu führen. So wird die während der Hypoxie/Ischämie entstandene Reduktion der PGB (A-L) hier offensichtlich durch die nachfolgende Hyperoxie kompensiert.

In sämtlichen Versuchsaugen liegt außerdem eine Erhöhung der Anzahl an BP/mm<sup>2</sup> vor. Die massivsten Steigerungen lassen sich dabei wieder in den linken Augen der Gruppen A und C finden, was das Schädigungsmuster bestätigt. Diese Ergebnisse weisen auf eine Verzögerung in der Gefäßmaturation hin. So führen die im Rahmen der Gefäßreifung stattfindenden, schon mehrfach erwähnten Differenzierungs- und

Umbauvorgänge, zum Abbau überflüssiger Endothelzellen und Gefäßverbindungen, was sich in einer Abnahme der BP äußert. Bei der Zählung der BP wurde eine wissenschaftlich anerkannte Methode verwendet, die schon in zahlreichen Publikationen veröffentlicht worden ist und nachweislich Aussagen über den Reifezustand eines Gefäßsystems treffen kann [32] [45] [44].

In A-L und C-L sind außerdem sowohl an P11 als auch an P21 lokale Gefäßpathologien zu finden, hier sind besonders die neovaskulären Tufts hervorzuheben. Sie bilden sich teils im Übergangsbereich von durchbluteter zu nicht durchbluteter Netzhaut und teils in Nachbarschaft zu großen Gefäßen. Die noch unreifen und teilweise geschädigten großen Gefäße rufen möglicherweise Störungen in der Konzentration von Wachstumsfaktoren in ihrer direkten Nachbarschaft hervor und führen somit zu Irritationen in Wachstum und Differenzierung der kleineren Gefäße. Auch die sich im vaskulären Übergangsbereich bildenden Tufts erwecken den Eindruck eines konfusen, orientierungslosen Wachstums. Dieses Bild kommt ebenfalls durch Störungen (vor allem) im VEGF-Gradienten zustande, da die Tip-Zellen an der vaskulären Front zwar nach einem Stimulus suchen, dieser jedoch offensichtlich nicht oder fehlerhaft vorhanden ist. Die Wachstumsrichtung für ein neues Gefäß ist also nicht eindeutig vorgegeben, was zum extraretinalen Wachstum der Endothelzellen und zur Bildung von Gefäßknäueln oder Tufts führt. Woher diese Orientierung der Zellen zum Glaskörper kommt, wurde schon eingehend in verschiedenen Tiermodellen untersucht, eine eindeutige Antwort konnte jedoch noch nicht gefunden werden. Die in den bekannten ROP- bzw. OIR-Modellen nachgewiesene Hochregulation von HIF1 $\alpha$  und VEGF als Reaktion auf das Verbringen von Hyperoxie in relative Hypoxie (Raumluft) [88] [159] [160] kann im PVL-Modell nicht der Grund für die Bildung der Tufts sein, da hier in Gruppe B keine Tufts gefunden wurden, möglicherweise weil hier der 24-stündige Insult zu kurz ist, um neovaskuläre Tufts hervorzurufen. Vielmehr scheint, wie oben bereits erklärt, die gestörte Ausschüttung von Wachstumsfaktoren durch die bereits geschädigten Gefäße der Grund für die Bildung der Gefäßknäuel zu sein. Weiterhin könnte auch das Fehlen retinaler Astrozyten im Übergangsbereich zu derartigen, vaskulären Fehlbildungen führen, da diese Gliazellen im Sinne einer Wachstumsschablone maßgeblich an der Gefäßorientierung beteiligt sind [24]. Aufgrund technischer Schwierigkeiten bei der GFAP-Färbung (starke PFA-Fixierung der Retinapräparate)

ist die Darstellung von Astrozyten in retinalen Randbereichen jedoch schwierig und die Ergebnisse sind mit Vorsicht zu interpretieren.

Als eine weitere lokale Gefäßpathologie wird die unvollständige Vaskularisierung der retinalen Peripherie beschrieben. Es handelt sich dabei um eine Pathologie, welche vornehmlich die periphere Ausbreitung bzw. Vernetzung der oberflächlichen Gefäßschicht betrifft. Diese tritt ausschließlich und in ähnlich starker Ausprägung in A-L und C-L an P21 und nur in Kombination mit der Retardation der Entwicklung des tiefen Gefäßplexus auf. Die in C-L zusätzlich zugeführte Hyperoxie scheint jedenfalls keinen zusätzlich schadhafte Effekt auf die Ausbreitung der Gefäßschichten auszuüben. Auch eine Beteiligung der oben schon erwähnten, mangelhaften Astrozytenunterlage in der retinalen Peripherie kann hier im Hinblick auf die lückenhafte Gefäßversorgung diskutiert werden und trägt sicher via VEGF-Mangel zur Wachstumsverzögerung bzw. Rückbildung der Gefäße bei.

Die beschriebenen Extravasationen treten gleich häufig an P11 und P21 und in beiden Augen der UCL-Interventionsgruppen (A-L, A-R, C-L, C-R) auf. Wie bereits erwähnt, handelt es sich dabei vermutlich um retinale Blutungen, dies kann jedoch nicht nur anhand der Isolectin B4- bzw. Fluoreszein-Ansammlungen mit Sicherheit behauptet werden, sodass der Befund „Blutung“ noch mittels einer anderen Technik bestätigt werden muss. Zumindest in den Fällen der größeren Isolectin-Ansammlungen bestätigt sich der Verdacht auf retinale Blutungen durch den makroskopischen Nachweis von Blut in der nativen Retina (während der Präparation sichtbar). Hier sind lokal so viele Erythrozyten aus einem Gefäß ausgetreten, dass es zur Ansammlung dieser in der Netzhaut kommt, es bildet sich ein Mikrohämatom. Die Rekrutierung retinaler Mikroglia zur Beseitigung des Hämatoms führt zu einer lokalen Reaktion und verstärkt die Isolectin-Färbung [148]. Bei kleineren Extravasationen ist der Nachweis ihrer „Identität“ schwieriger. Je nach Menge bzw. Größe der Extravasation ist diese makroskopisch im nativen Zustand nicht erkennbar bzw. bereits abgebaut.

Ursächlich für die Extravasationen bzw. Blutungen ist vermutlich die in den Tiergruppen A und C induzierte Ischämie und nachfolgende Hypoxie. Die Hyperoxie scheint, wie bei vielen anderen erwähnten Gefäßpathologien, hier keinen zusätzlich schädlichen Einfluss auszuüben, während die permanente Ischämie vor allem in A-L

und C-L zur Minderversorgung und somit zum Absterben von Endothelzellen führt. Die darauffolgende Hypoxie schädigt Endothelzellen in beiden Augen der Tiere und ruft somit Apoptose und Extravasationen hervor.

Dass solche Austritte von Gefäßflüssigkeit teilweise auch in Assoziation mit nevoaskulären Tufts gefunden werden, spräche für eine Fenestrierung und somit *vascular leakage* der Zubildungen. Um diese Frage jedoch abschließend zu klären, wären entweder *in vivo* Funduskopieaufnahmen dieser Netzhautstellen oder der Immunfluoreszenznachweis von Ng2 als Perizyten-Marker nötig, da eine Perizyten-Ummantelung der Tufts eine Fenestrierung ausschließen würde. Dieser Nachweis wurde zwar versucht, konnte jedoch (aufgrund der starken PFA-Fixierung der Retinae) in besagten Bereichen nicht eindeutig gelingen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass, innerhalb der untersuchten Gruppen, in den zur UCL ipsilateralen Augen stets die schwerste Schädigung des retinalen Gefäßsystems auftritt. Für das Gehirn konnte bereits gezeigt werden, dass sich eine unilaterale ACC-Okklusion fast ausschließlich auf die ipsilaterale Hemisphäre auswirkt [156]. Das vollständige Ausbleiben der Durchblutung auf der ipsilateralen Seite wird jedoch meist durch Kollateralgefäße verhindert, sodass eine gewisse Rest-/Mindestversorgung erhalten bleibt [161]. Auch für das retinale Gefäßsystem konnte von Ogishima et al. gezeigt werden, dass die permanente Ligatur der Arteria carotis externa (ACE) und der Arteria pterygopalatina (APP) zwar zuerst zum völligen Ausbleiben der Blutversorgung in der entsprechenden Retina führen, sich nach einigen Tagen jedoch wieder eine gewisse Mindestdurchblutung einstellt [3]. Ähnliches lässt sich auch für A-L und C-L in der vorliegenden Arbeit vermuten, denn zu den Untersuchungszeitpunkten P11 und P21 besteht durchaus eine (mehr oder weniger) funktionstüchtige Gefäßversorgung dieser Netzhäute. Eine Abstufung im Schädigungsgrad kann zwischen A-L und C-L nur schwer vorgenommen werden. Diese Tatsache gibt einen Hinweis darauf, dass die 24-stündige Hyperoxie in C-L vermutlich keinen zusätzlichen Schaden anrichtet. Beiden Protokollen gemein ist jedoch die UCL sowie die einstündige Hypoxie. Um diese Hypothese bestätigen zu können, wären jedoch zusätzliche Versuchsgruppen (z.B. UCL + Hyperoxie, UCL komplett ohne Sauerstoffbehandlung oder Hypoxie ohne UCL) nötig.

Die permanente Ischämie führt grundsätzlich unter anderem zu einer Heraufregulation des gewebsschädlichen NOS-2 [98] (vor allem an P7) und somit zu

einer Schädigung der Gefäßwände in diesen Augen. Sauerstoff- und/oder Nährstoffunterversorgung tragen vermutlich ebenfalls zum Absterben von Endothelzellen bei. Der auf die UCL folgende hypoxische Insult dauert nur eine Stunde an und wäre alleine wohl zu kurz, um ernsthaften Schaden in der Netzhaut anzurichten. In Kombination miteinander potenzieren sich die Ischämie und die 6%ige Hypoxie möglicherweise und wirken so zusätzlich an Manifestation der Pathologie mit.

#### **4.1.3. Interpretation der morphologischen Gefäßveränderungen im PVL – Rattenmodell im Vergleich zu anderen ROP – Modellen**

Im PVL-Rattenmodell lassen sich anhand der Schwere der Gefäßveränderungen zwei Gruppen unterscheiden: 1.) Die zur UCL ipsilateralen Augen, welche zusätzlich noch 1h Hypoxie (A-L) und 24h Hyperoxie (C-L) ausgesetzt waren und 2.) die zur UCL kontralateralen Augen (A-R mit zusätzlich 1h Hypoxie bzw. C-R mit zusätzlich 1h Hypoxie und 24h Hyperoxie) sowie beide Augen der Gruppe B (keine UCL, nur 24h Hyperoxie). In A-L und C-L treten insgesamt mäßige, morphologisch sichtbare Gefäßveränderungen auf, welche bereits eingehend beschrieben wurden und sich hauptsächlich in einer Wachstumsverzögerung des tiefen Gefäßplexus, verspäteter bzw. gestörter Gefäßreifung, sowie diversen lokalen Gefäßpathologien (neovaskuläre Tufts) äußern. Für A-R, C-R und B dagegen werden lediglich leichte Gefäßveränderungen bezüglich Plexusentwicklung und Gefäßreifung gefunden, lokale Gefäßpathologien treten äußerst selten auf.

Zur Beurteilung der retinalen Gefäßveränderungen im PVL-Rattenmodell bietet sich der direkte Vergleich mit anderen ROP- bzw. retinalen Ischämie-Modellen an (Tabelle 23). Als repräsentative Vertreter werden hierfür das OIR-Mausmodell nach Smith, das ROP-Rattenmodell nach Penn sowie ein Modell für retinale Ischämie verwendet, welches 2007 etabliert [4] und seitdem mehrfach modifiziert und angewendet wurde [3]. Zur Induktion der retinalen Ischämie werden hier bei 8-10 Wochen alten Mäusen die linke ACE und/oder die APP temporär ligiert. Beide Arterien entspringen aus der ACC, wobei die APP über die Arteria ophthalmica die direkte Blutversorgung des Auges sichert [3] [4] (siehe Abbildung 3). Die Ligatur wird nach 3h, 5h bzw. 5d

entfernt und die Tiere werden nach 24h (3h Ischämie + 21h Reperfusion bzw. 5h Ischämie + 19h Reperfusion) bzw. 5d (Ischämie) getötet und die Augen untersucht, eine zusätzliche Sauerstoffbehandlung erhalten diese Tiere nicht.

Intervention/ Modell	Smith	Penn	Retinales Ischämiemodell		PVL	
			Auge links	Auge rechts	A-L/C-L	A-R, B, C- R
Alter der Tiere bei Versuchsbeginn	P7	P0	8 – 10 Wochen		P6	
Ischämie	nein	nein	Tempo- räre (3h, 5h und 5d) Ligatur der ECA und PPA (ipsi- lateral)	Tempo- räre Ligatur der ECA und PPA (kontra- lateral)	Perma- nente UCL (ipsi- lateral)	Perma- nente UCL (kontra- lateral in A-R und C-R) bzw. keine UCL (B)
Dauer Hyperoxie	5d (75%); P7 – P12	24h (50%; im ständigen Wechsel mit 10% Hypoxie)	-		24h; 80% in B und C bzw. keine bei A	
Dauer Hypoxie	13d (21% Raumluft als relative Hypoxie); P12 – P25	24h (10%, im ständigen Wechsel mit 50% Hyperoxie)	-		1h; 6% in A und C bzw. keine in B	
Dauer Sauerstoff- intervention gesamt	5d	14d	-		1h in A bzw. 24h in B bzw. 25h in C	
Versuchsdauer/Alter bei Versuchsende	18d/P25	18d/P18	24h (3h Ischämie+21h Reperfusion bzw. 5h Ischämie +19h Reperfusion) bzw. 5d (5d Ischämie ohne Reperfusion)/P56 – P80		1d/P7 bzw. 5d/P11 bzw. 16d/P21	
Avaskuläre Bereiche	zentral	peripher	Komplett avasku- läre Netzhaut	keine	Sporadisch peripher	keine
Neovaskuläre Tufts	Regelmäßig im Übergangs- bereich	Regelmäßig im Übergangs- bereich	keine		Sporadisch im Übergangs bereich	Selten in A-R
Schweregrad der Gefäßpathologie	schwer	schwer	schwer	Keine Patho- logie vorhan- den	mittel	leicht
Regression der Gefäßveränderungen bis	P25	P30	-		An P21 noch nicht vollzogen	

Tabelle 23: Vergleich PVL-Rattenmodell - gängige OIR-/ROP-Modelle

Zwischen den Modellen bestehen einige grundlegende Unterschiede. Während in den Modellen nach Smith und Penn die Tiere ausschließlich verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt sind, erhalten sie dagegen im Ischämie-Modell nur eine Gefäßligatur ohne Sauerstoffbehandlung. Das PVL-Modell stellt somit eine Mischung beider Varianten dar, da hier das Versuchsdesign sowohl eine Gefäßligatur als auch die Exposition gegenüber verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen vorsieht. Die unterschiedlichen Kombinationen aus Ischämie, Hypoxie und Hyperoxie schaffen hier somit ein relativ komplexes Versuchssetup mit verschiedenen Versuchsgruppen.

Die retinale Ischämie im PVL-Modell ist permanent und könnte mit der fünftägigen Ischämie im Ischämie-Modell verglichen werden. In beiden Modellen ist dabei fast ausschließlich das zur Ischämieseite ipsilaterale Auge durch die Gefäßligatur beeinträchtigt. Wie Ogishima et al. 2011 zeigen konnten, ist 3-5 Stunden nach dem Eingriff im linken Auge so gut wie keine Durchblutung der Netzhaut vorhanden, dieser Zustand erholt sich bei andauernder Ischämie bis Tag fünf langsam wieder etwas, die Vaskularisierung bleibt jedoch eingeschränkt. Auch im PVL-Modell sind, innerhalb der untersuchten Gruppen, die linken Augen der UCL-Gruppen am Stärksten geschädigt und weisen an P11 (fünf Tage nach dem Eingriff) bzw. P21 deutliche Gefäßveränderungen auf. Interessanterweise wird nach fünf Tagen Ischämie jedoch im Ischämie-Modell (Okklusion der ACE und APP) eine weitaus größere retinale Gefäßschädigung beobachtet als im PVL-Modell (Verschluss der ACC). Der Grund hierfür könnte die Bildung von Gefäßkollateralen bzw. -anastomosen sein. Bei einem Verschluss der ACC kommt es zwischen ACE und ACI (Arteria carotis interna) zur Bildung von Gefäßanastomosen und somit einem retrograden Blutfluss aus der ACE in die ACI (siehe Abbildung 3). Eine gewisse Restversorgung der entsprechenden Gewebe ist somit gewährleistet [3] [162]. Bei Ligatur der ACC im Ischämie-Modell lässt sich deshalb vermutlich eine weniger dramatische Durchblutungsstörung in der Netzhaut beobachten als bei Verschluss der ACE und der APP einzeln [3]. Um die Gefäßversorgung der Retina zuverlässig abzuschneiden, ist es deshalb offensichtlich effektiver, jedes Gefäß einzeln zu ligieren.

Anhand der vorliegenden Daten kann behauptet werden, dass, innerhalb der untersuchten Gruppen, die Augen A-L und C-L den größten Schaden aufweisen. Die Ischämie scheint damit maßgeblich an der Manifestation der Pathologie beteiligt zu

sein. Um die Effekte der Ischämie einzeln sowie der zusätzlichen Sauerstoffbehandlung genauer verifizieren zu können, wäre jedoch die Untersuchung zusätzlicher Gruppen nötig (z.B. ausschließlich UCL ohne Sauerstoff, UCL + Hyperoxie usw.). Die in C-L zusätzliche, 24stündige Hyperoxie führt hier jedenfalls nicht zu einer Verschlimmerung des Krankheitsbildes. Die von den anderen Modellen bekannten neovaskulären Gefäßzubildungen (Tufts) scheinen dagegen wohl durch die zusätzliche Sauerstoffbehandlung induziert zu sein, da diese im Ischämie-Modell selbst nicht auftreten (siehe Tabelle 23). Der zusätzliche Stimulus der Hypoxie (und Hyperoxie) führt hier möglicherweise zu einer zusätzlichen Verschiebung in der Expression angiogener Wachstumsfaktoren, welche in Folge das knäuelartige Gefäßwachstum in den Glaskörper hervorruft. Die zur Ligatur kontralateralen Augen weisen im Ischämie-Modell keinerlei Veränderungen auf [3]. Auch im PVL-Modell sind die Veränderungen in A-R und C-R äußerst gering.

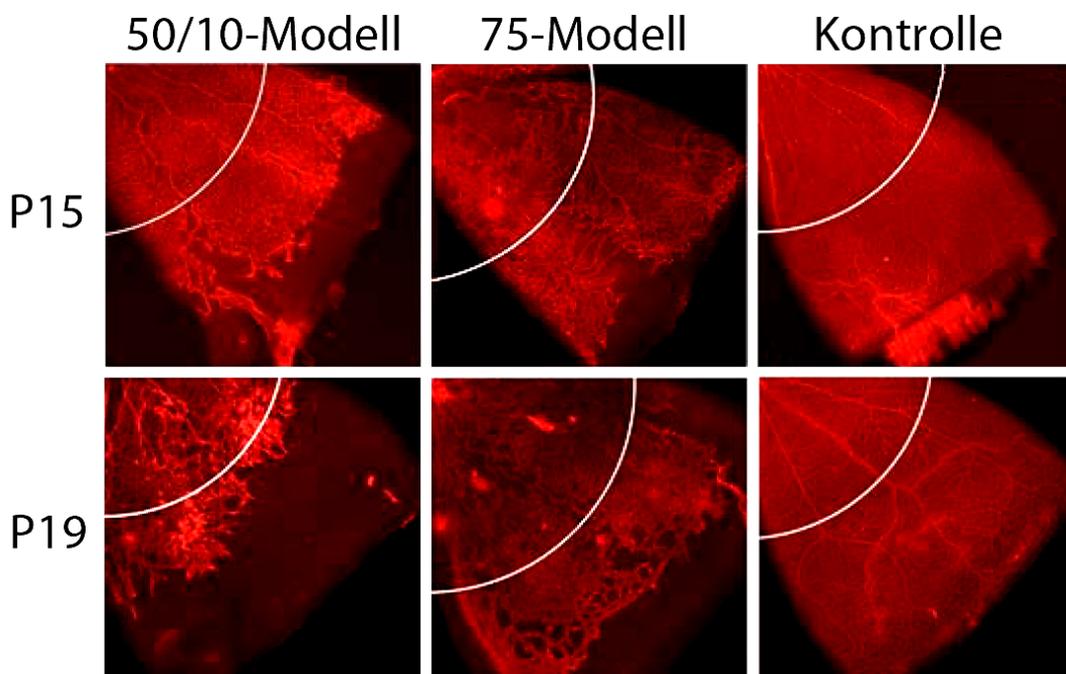
Betrachtet man die Sauerstoffbehandlung in den unterschiedlichen Modellen, so bezieht sich der gravierendste Unterschied auf die Gesamtinterventionszeit, welche im PVL-Modell am Kürzesten ist. Das Mausmodell nach Smith sieht ein fünftägiges Verbringen der Tiere in 75%ige Hyperoxie vor, die darauffolgende Raumluft stellt für die Tiere während der ersten 24 Stunden eine relative Hypoxie dar und trägt entscheidend zur Ausprägung der Gefäßpathologie bei. Im Rattenmodell nach Penn werden die Tiere sogar 14 Tage lang wechselnden Sauerstoffkonzentrationen von 50% und 10% ausgesetzt (Wechsel im 24h-Rhythmus). Die Sauerstoffexpositionszeiten im PVL-Modell dagegen sind deutlich kürzer und beschränken sich auf eine Stunde Hypoxie (6%) bzw. 24 Stunden Hyperoxie (80%), somit maximal 25 Stunden Sauerstoffintervention. Die nur leichten Gefäßveränderungen in den Augen, die nicht von der Ischämie sondern ausschließlich von der Sauerstoffexposition betroffen sind (A-R, B, C-R) zeigen, dass für die maximale Ausprägung der Gefäßpathologie nicht eine möglichst hohe Hyperoxie bzw. niedrige Hypoxie entscheidend ist, sondern offensichtlich vielmehr die Dauer der Exposition insgesamt. Dies geht auch aus initialen Experimenten von Penn zur Etablierung des ROP-Rattenmodells hervor. Die Wissenschaftler verglichen Schädigungsmuster von neonatalen Ratten, die von P0 an für 14 Tage im 24-Stunden-Rhythmus wechselnden Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt worden

waren. Untersucht wurde dabei eine Tiergruppe mit alternierenden Sauerstoffleveln zwischen 40% und 80% (40/80) und eine Gruppe mit wechselnden Leveln zwischen 10% Sauerstoff und 50% Sauerstoff (50/10). Die Netzhautgefäße der 50/10 Gruppe zeigten nicht nur deutlich schwerwiegendere Retardation in ihrer Entwicklung, sondern auch massivere neovaskuläre Gefäßzubildungen [107]. Die Ergebnisse dieser Arbeiten zeigen also deutlich, dass die Ausprägung der Pathologie nicht von einer möglichst hohen Sauerstoffzufuhr im Rahmen der Fluktuation abhängig ist. Bei einer Exposition über 14 Tage (Rattenmodell) bzw. ca. fünf Tage (Mausmodell) bleibt dem Sauerstoff offensichtlich ausreichend Zeit, die jeweiligen Gefäßveränderungen auszulösen. Eine „Einwirkzeit“ der Hypoxie bzw. Hyperoxie von nur 25 Stunden (im PVL-Modell) reicht möglicherweise als Intervention für die Entwicklung einer partiell avaskulären Retina bzw. neovaskulärer Zubildungen nicht aus, sondern führt mehr zu subtilen Gefäßveränderungen, die ausschließlich in höheren Mikroskopvergrößerungen und mittels detailbezogener Analysemethoden zu erfassen sind.

Auch die Reihenfolge der Sauerstoffintervention weicht im PVL-Modell von den beiden anderen genannten Modellen ab. Während bei Smith und Penn die Sauerstoffintervention jeweils mit der Hyperoxie startet, um einen Stopp im Gefäßwachstum zu erzeugen, beginnt man im PVL-Modell mit der (Ischämie und) Hypoxie. Dass dieser initiale Impuls für die VK und VO ungemein wichtig ist, zeigt die Tatsache, dass im PVL-Modell nicht annähernd eine vergleichbare Fläche an avaskulärer Retina entsteht wie zentral im OIR-Mausmodell und peripher im ROP-Rattenmodell.

Penn konnte weiterhin herausfinden, dass die Lokalisation und Ausdehnung der avaskulären Bereiche abhängig von der Höhe der Sauerstoffzufuhr ist. Bei einer Zufuhr von 70-80% kommt es offensichtlich zur zentral avaskulären Netzhaut (siehe OIR-Mausmodell), während niedrigere Werte (50%) eine peripher avaskuläre Netzhaut hervorrufen (siehe ROP-Rattenmodell) [107]. Die Tatsache, dass es im PVL-Modell trotz der hohen Sauerstoffzufuhr (80%) zu einer mehr peripher als zentral avaskulären Netzhaut kommt, wurde bereits von Akula et al. 2010 untersucht (Abbildung 59). Demnach ist ein Vergleich des OIR-Mausmodells mit ROP-Rattenmodell nicht ohne weiteres möglich ist. Wesentliche Unterschiede zwischen diesen beiden murinen Spezies lassen sich deutlich anhand der sog. 75-Ratten aufzeigen (neonatale Ratten, die dem Sauerstoffregime der OIR-Maus ausgesetzt

werden). Der Phänotyp dieser Ratten ist sehr viel milder (kleinere avaskuläre Bereich zentral und peripher sowie deutlich weniger neovaskuläre Zubildungen als im 75-Mausmodell). Anders als im 75-OIR-Mausmodell führt bei der neonatalen Ratte das Verbringen in konstante Hyperoxie offensichtlich nicht notwendigerweise zur massiven Ausbildung vasoobliterativer und neovaskulärer Gefäßreaktionen [163]. Da das Ausmaß der VO bekanntlich mit dem Grad der NV korrespondiert, ist die geringe Anzahl an Tufts im Hinblick auf die kleinen avaskulären Bereiche der Retina im PVL- und im 75-Rattenmodell nicht verwunderlich. Die 50/10-Tiere jedoch zeigen allesamt die bereits bekannten, neovaskulären Veränderungen [163].



**Abbildung 59: Vergleichende Darstellung von 50/10-, 75- und Kontrollretinae**  
Die VO an P15 sowie die NV an P19 sind im 50/10-Rattenmodell deutlich stärker ausgeprägt als im 75-Rattenmodell; modifiziert nach Akula 2010

Grundsätzlich ist das PVL-Rattenmodell zur Beurteilung ROP-relevanter Veränderungen des retinalen Gefäßsystems durchaus geeignet. Die kurzen Interventionszeiten (1h bzw. 24h) im Vergleich zu anderen Modellen entsprechen hier möglicherweise viel besser der realen Situation, in welcher die Frühgeborenen häufig wechselnden und kurzen Zeitperioden andauernden Sauerstoffpartialdrücken ausgesetzt sind [164].

## **4.2. Interpretation der Genexpressionsveränderungen im PVL – Rattenmodell im Vergleich zu anderen ROP - Modellen**

Die Expressionsveränderungen in den untersuchten Genen sind, bis auf wenige Ausnahmen, von geringem Ausmaß. Trotzdem lassen sich einige Tendenzen in Richtung der Genexpression z.B. im OIR-Mausmodell erkennen. Auch hier darf man jedoch nicht vergessen, dass es sich um zwei unterschiedliche Modelle mit unterschiedlichen Spezies handelt, zwischen welchen durchaus Unterschiede bestehen und zu erwarten sind.

In einer umfangreichen Genexpressionsstudie zum OIR-Mausmodell mittels Microarrays wurden 2009 von Sato et al. zahlreiche, ROP bzw. OIR relevante Gene untersucht. Dazu gehört z.B. HIF1 $\alpha$ , bei welchem vor allem an P12 und P13 eine massive „Upregulation“ beobachtet werden kann, die sich bis P14 schnell wieder normalisiert [88]. Sears et al. konnten durch Stabilisierung von HIF1 $\alpha$  während der Hyperoxiephase eine konsekutive VO verhindern und somit die Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors an der Pathogenese der OIR ebenfalls nachweisen [159]. Die Stabilisierung von HIF1 $\alpha$  in der ersten, vasoobliterativen Phase könnte hier ein möglicher Therapieansatz sein, um VO und ihre Folgen zu verhindern [108].

Die Injektion eines VEGF-bindenden Proteins erbrachte außerdem schon 1995 über das Ausbleiben der pathologischen NV den Nachweis über eine Beteiligung von VEGF an der neovaskulären Gefäßantwort im OIR-Modell [160]. In der Genexpressionsstudie von Sato konnte weiterhin festgestellt werden, dass VEGF-A an P12 (also direkt im Anschluss an die Hyperoxie) nur minimal verändert ist und (als HIF nachgeschaltetes Gen) seine Expression erst im Laufe der folgenden Tage (Raumlufte als relative Hypoxie) ansteigt [88]. Watanabe et al. konnten an P12 sogar eine Herabregulation von VEGF-A nachweisen [89]. Dieses Expressionsmuster ist ohne Zweifel auf die vorhergehende Hyperoxie zurückzuführen und lässt sich auch im PVL-Modell erkennen. Hier findet in den Gruppen B und C im Anschluss an die (an P6 stattfindende) Hyperoxie eine Herabregulation von VEGF-A statt. Die Herabregulation in der Hyperoxie-Gruppe kann als Bestätigung für die Funktionalität des Modells angesehen werden. Damit wären der hyperoxische Einfluss sowie die Reaktionen der Retina darauf bewiesen. In Gruppe B scheint die 24-stündige Hyperoxie nur geringe Effekte im Hinblick auf die Gefäßschädigung zu haben, wohl wirkt sie sich jedoch deutlich hemmend auf die Gefäßreifung aus. In Gruppe C wird

für C-R eine stärkere Herabregulation von VEGF-A als für C-L beobachtet. Offensichtlich fungiert die in C-L vorhandene Ischämie als eine Art Kompensator für die VEGF-Expression, welcher die Hypoxie-bedingte Herabregulation abschwächt. In Gruppe A, welche dagegen nicht mit der Hyperoxie behandelt wurde, bleibt die Herabregulation von VEGF aus bzw. finden sich hier keine nennenswerten Veränderungen in der VEGF Expression. Die für A-L gefundenen Gefäßschädigungen werden demnach vermutlich nicht durch Variationen in der VEGF-A Expression induziert. Die VEGF Expression normalisiert sich bis P11 weitestgehend und in fast allen Gruppen wieder, da die Tiere ab P7 wieder in Normoxie sitzen. Im Gegensatz zu zahlreichen Untersuchungen der VEGF Expression im OIR-Mausmodell [88] [159] [160] kommt es hier, wahrscheinlich aufgrund der Kürze des Insults, in keiner Gruppe zu einer Überexpression als Reaktion auf die relative Hypoxie der Raumluft, was auch erklären könnte, warum nur minimale neovaskuläre Gefäßreaktionen vorhanden sind.

Auch die EPO-Expression im OIR-Mausmodell wurde untersucht und erreicht, wie VEGF, ihren Höhepunkt an P17, sodass EPO via EpoR nachweislich zu einer erhöhten Endothelzellproliferation in der vasoproliferativen Phase der Erkrankung beiträgt [89]. In der frühen, hyperoxischen Krankheitsphase jedoch wird die EPO Expression in Abhängigkeit von HIF1 $\alpha$  stark herunterreguliert. Eine exogene Verabreichung von EPO in dieser Krankheitsphase konnte somit wirksam den primären Gefäßverlust sowie auch die NV und den Hypoxie-bedingten Neuronenverlust in der zweiten Krankheitsphase verhindern. Diese Effekte werden unter anderem durch die systemische Rekrutierung von pro-angiogenen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, durch Aktivierung des *pro-survival factors* *Nf $\kappa$ B* via EpoR und durch die lokale Verhinderung von Apoptosevorgängen vermittelt [94]. 2011 konnten Wu et al. außerdem zeigen, dass durch eine Blockierung von EpoR durch entsprechende Antikörper die NV ebenfalls reduziert werden kann [93]. Da im PVL-Modell keine nennenswerten Veränderungen in der EpoR Expression gefunden werden konnten, empfiehlt sich hier die zusätzliche Untersuchung von EPO.

In ihrer Expressionsstudie konnten Sato et al. außerdem eine extreme Heraufregulation von TNF $\alpha$  zwischen P13 und P18 (mit einem Maximum an P15) und nochmals an P21 zeigen, und somit die Beteiligung von TNF $\alpha$  in der sekundären Phase des OIR-Modells nachweisen [88]. TNF $\alpha$  ist einer der Hauptmediatoren von

Entzündungsreaktionen und kann zahlreiche Veränderungen in der Genexpression von Endothelzellen hervorrufen. Dazu gehört z.B. die Induktion von Adhäsionsmolekülen oder Integrinen oder auch die Vermittlung sowohl pro- als auch anti-angiogener Effekte [28], wobei diese noch genauer untersucht werden müssen. In initialen Arbeiten zu diesem Thema, wie z.B. von Sainson et al., wird TNF $\alpha$  als Mediator zwischen Entzündungs- und Gefäßbildungsreaktionen identifiziert, welcher beide Vorgänge aufeinander abstimmt [28]. Im PVL-Modell kommt es vor allem in A-L und C-L zu einer Heraufregulation des Gens. Da auch die morphologisch schwerwiegendsten Veränderungen in diesen Augen gefunden wurden, könnte die retinale Ischämie mit nachfolgender Reperfusion (durch Gefäßkollaterale) via TNF $\alpha$ -Modulation als Hauptinduktor der Gefäßveränderungen angesehen werden.

Die Gefährlichkeit des sog. Ischämie-Reperfusionsschadens ist bereits zur Genüge aus der Herzinfarkt- bzw. Schlaganfallforschung bekannt. Durch die Ischämie kommt es an den Endothelien der betroffenen Gefäße zu Zellschädigungen und Apoptosevorgängen und zu einer massiven Störung des Kalium- und Kalziumhaushalts. Das Wiedereinsetzen der Durchblutung führt dann im Anschluss zur Bildung der schon mehrfach erwähnten ROS. Diese hochreaktiven Sauerstoffradikale rufen in den Endothelzellen eine Zellschädigung durch Lipid- und DNA-Oxidation und somit Degeneration von Gefäßen hervor. Durch die Gefäßdefekte werden in der Folge Entzündungszellen angezogen, sodass es auch noch zur intravasalen Ansammlung von Leukozyten und Blutplättchen und somit zu Entzündungsreaktionen im Gefäß und dem umliegenden Gewebe kommt [165] [166]. Die Beteiligung von TNF $\alpha$  an diesen retinalen Entzündungsreaktionen konnte bereits von Berger et al. nachgewiesen [167] und nun für das PVL-Modell bestätigt werden. Als Marker für den sog. nitro-oxidativen Stress wurde in Satos Studie auch NOS-2 untersucht, welches, ähnlich wie TNF $\alpha$ , maximal an P17 und dann wieder an P21 exprimiert wird [88]. Neben der Hypoxie-induzierten Induktion von NOS-2 ist auch eine durch Inflammation-bedingte Induktion (z.B. durch Makrophagen assoziierte Zytokin Ausschüttung) von NOS-2 in Endothelzellen möglich [168]. NOS-2 fördert dann die Bildung hochreaktiver Stickstoffmonoxid-Moleküle (NO). Diese haben, ähnlich wie ROS, in hoher Konzentration zelltoxische Wirkung, indem sie mit Proteinen oder DNA reagieren und diese so schädigen [97] [98]. Die Beteiligung von NOS-2 bzw. NO konnte bereits für die vasoobliterative als auch für die neovaskuläre Gefäßreaktion im OIR-Modell nachgewiesen werden. So waren Zhang et al. im

Rahmen eines Ischämie-Reperusionsmodells durch eine Inhibition von NOS-2 in der Lage, die Degeneration kleinerer Gefäße zu verhindern [169]. He et al. konnten 2007 ebenfalls durch NOS-2-Inhibition die Bildung neovaskulärer Gefäße verhindern. Im gleichen Zug führte die NOS-2-Inhibition hier auch zu einer verminderten HIF1 $\alpha$ - und VEGF-Expression, weshalb ein interaktives Zusammenspiel zwischen diesen drei Faktoren postuliert wird [95]. Die Beteiligung von NOS-2 an den Gefäßveränderungen des PVL-Modells kann durch die Ergebnisse der quantitativen PCR bestätigt werden. Relevante Veränderungen in der NOS-2 Expression können, genau wie relevante Veränderungen in der Gefäßmorphologie, nur in A-L und C-L gefunden werden. So kommt es an P7 zu einer massiven Hochregulation, die über P11 und P21 in eine leichte Herabregulation übergeht.

Die Modulationen der NOS-2 (und TNF $\alpha$ ) Expression in A-L und C-L stellen neben der VEGF-A Herabregulation in den Gruppen B und C-L die bedeutendsten Veränderungen in der retinalen Genexpression im PVL-Modell dar und bieten daher wirkungsvolle Ansatzpunkte für den Einsatz vasoprotektiver Substanzen (siehe 4.4).

### **4.3. Korrelation von Schäden an Retina und Gehirn**

Da im PVL-Modell erstmals neben dem Gehirn der Tiere auch die Augen entnommen und untersucht wurden, ist mittelfristig eine Korrelation der Ergebnisse geplant. Bezüglich eines möglichen Zusammenhangs von ROP und PVL existieren derzeit nur wenige Daten.

Dass das zusätzliche Vorhandensein einer PVL die Schwere der akuten ROP beeinflusst, konnte zwar von Huang et al. widerlegt werden, jedoch wurden hier die Kinder ausschließlich während der akuten Erkrankungsphase kurz nach der (Früh-) Geburt untersucht [170]. Yang et al. stellten weiterhin fest, dass 26% der in ihrer Studie untersuchten ROP-Kinder zusätzlich auch an PVL litten und dass die PVL bei Langzeitbeobachtungen über sieben Jahre zu einem eingeschränkten *visual outcome* der ehemaligen ROP-Patienten beiträgt [171]. Bei der Korrelation der beiden Erkrankungen muss demnach zwischen den akuten und Langzeitschäden der ROP unterschieden werden.

Aufgrund ihrer ähnlichen Ätiologie bestehen vermutlich noch mehr Zusammenhänge in Ausprägung, Verlauf und Heilung der Krankheiten, sodass sich die genauere Untersuchung der Wechselwirkungen im Tiermodell anbietet. Der Vergleich der Daten verspricht neue Informationen über die krankheitsrelevanten Zusammenhänge zwischen diesen beiden Organen und soll vor allem die Befundung des Schweregrads der PVL anhand von Augenveränderungen ermöglichen.

Derzeit stehen jedoch die Ergebnisse der Gehirnanalysen noch aus, sodass dieser Punkt hier nicht mit berücksichtigt werden kann.

#### **4.4. Ausblick/mögliche Therapieansätze**

Neben der direkten Schädigung des retinalen Gefäßsystems wurde im PVL-Modell auch eine durch die Ischämie und Hypoxie/Hyperoxie verzögerte bzw. gestörte Gefäßreifung in der Netzhaut beobachtet. In den anderen Modellen können zur Reifung keine oder nur noch wenige Beobachtungen gemacht werden, da hier die Gefäßschädigung selbst überwiegt.

Das PVL-Modell kann demnach zukünftig in zweierlei Richtungen weiterentwickelt und genutzt werden. Der Wert des Modells für Untersuchungen zur Gefäßreifung soll hier noch einmal explizit erwähnt werden, da andere Modellsysteme für die Gefäßreifung ebenfalls eher mit kürzeren Sauerstoffinterventionszeiten arbeiten. Sauerstofffluktuation wird hier nicht eingesetzt, sondern die Tiere werden permanenter Hypoxie [37] oder permanenter Hyperoxie [33] ausgesetzt, um das *vascular remodeling* zu verzögern. Besonders die Hyperoxie-Gruppe spielt hier im PVL-Modell eine wichtige Rolle, da hier bezüglich der Gefäßreifung bedeutende Veränderungen gefunden werden konnten.

Das PVL-Modell oder eine modifizierte Variante mit minimal verlängerten Sauerstoffexpositionszeiten kann demnach durchaus auch zukünftig zur morphologischen Untersuchung der Gefäßmaturation dienen. Es empfehlen sich außerdem Expressionsanalysen weiterer, am *vascular remodeling* beteiligter Gene. Hierfür kommen z.B. BMP9/10, Endoglin, TGF $\beta$  oder auch ICAM-1 in Frage, da für diese Gene bereits in anderen Modellen eine Beteiligung an der Gefäßreifung gezeigt werden konnte [44] [45] [43] [33].

Bezüglich der Gefäßschädigung selbst kommt das PVL-Modell in einigen Punkten der Realität näher als die extremen Modelle von Smith und Penn. Der mäßige Grad

der Gefäßschädigung (in den von der Ischämie direkt betroffenen Augen) spiegelt die Pathologien vieler Frühgeborener besser wieder und auch die kurzen Sauerstoffinterventionszeiten entsprechen eher der klinischen Situation. Viele Frühgeborene leiden im Rahmen einer ROP tatsächlich nur unter mäßigen Veränderungen der retinalen Gefäße, sodass hier anhand des PVL-Modells effektive Behandlungsstrategien für mittelschwer betroffene Kinder entwickelt werden könnten (siehe unten).

Für ein weniger kompliziertes Versuchsdesign könnte Gruppe B in Zukunft aus dem Versuch genommen werden, da hier keine zusätzlichen Erkenntnisse bezüglich der Gefäßschädigung zu erwarten sind. Die zur Ischämie kontralateralen Augen (A-R und C-R) sind ebenfalls zu vernachlässigen. Für eine stärkere Manifestation des Phänotyps in A-L und C-L sollte die Ischämie in jedem Fall beibehalten und die zusätzlichen Sauerstoffinterventionszeiten eventuell ein wenig verlängert werden.

Der Einsatz von EPO zur Therapie der Augenerkrankung ist im PVL-Modell wenig empfehlenswert, da in der Retina zumindest der EPO-Rezeptor keine veränderte Expression aufweist. Vielversprechend (speziell im Hinblick auf das Auge) wäre dagegen die Behandlung mit NOS-2-Inhibitoren wie N-nitro-L-Arginin (N-LA), Aminoguanidin-Hemisulfat oder 1400W. In verschiedenen Arbeiten konnte mit diesen Stoffen, abhängig von Modell und Behandlungszeitpunkt, sowohl VO als auch NV und retinale Degeneration im Auge abgeschwächt bzw. sogar verhindert werden [97] [95] [96].

Abschließend erweisen sich die Pathologien des retinalen Gefäßsystems im PVL-Rattenmodell als eine realistische Imitation milder ROP-Veränderungen. Durch Korrelation von Gefäß- und Gehirnpathologien sollen langfristig Schlüsse von Augenveränderungen auf den Schweregrad der PVL gezogen werden können. Durch geringe Modifikationen im Versuchsssetup ist die Optimierung des Modells möglich, sodass einerseits der Effekt verschiedener therapeutischer Wirkstoffe bzw. die Expression von am *vascular remodeling* beteiligter Gene ermittelt werden kann.

## 5. Zusammenfassung

In der Arbeit „Netzhautgefäßpathologien in einem Rattenmodell für periventrikuläre Leukomalazie - ein neues Modell für die Frühgeborenenretinopathie beim Menschen?“ wurde im Rahmen einer interdisziplinären Forschungsk Kooperation zwischen der Augenklinik Gießen und der Kinderklinik Marburg ein Rattenmodell für die periventrikuläre Leukomalazie etabliert. Da die PVL bei frühgeborenen Babys häufig in Kombination mit der Frühgeborenenretinopathie auftritt, wurden (neben dem Gehirn durch die Marburger Gruppe) auch die Augen der Versuchstiere untersucht. Die Analyse beider Organe im selben Tierversuch verspricht neue und wertvolle Daten, da bisher ausschließlich Tiermodelle für die PVL und die ROP einzeln existierten.

Im Versuch erhielten neonatale Rattenwelpen an P6 eine unilaterale Ligatur der Arteria carotis communis und wurden in vier Gruppen unterschiedlichen hypoxischen und/oder hyperoxischen Bedingungen ausgesetzt. Die Augen der Tiere wurden danach zu verschiedenen Zeitpunkten *in vivo* fluoreszenzangiographisch und *post mortem* molekularbiologisch und immunhistochemisch untersucht.

Bei den Tieren ließ sich eindeutig eine Wachstumsverzögerung bzw. Schädigung des retinalen Gefäßsystems feststellen. Dazu gehörte eine Retardation der Entwicklung des tiefen retinalen Gefäßplexus, Verzögerungen in der endgültigen Differenzierung des Gefäßdurchmessers, Hypoxie/Ischämie- bzw. Hyperoxie bedingte Variationen in der Kapillarformation und eine eindeutig verlangsamte Maturation des gesamten Gefäßnetzwerks. Bezüglich der Genexpression wurden insgesamt milde Veränderungen beobachtet, sehr auffällig waren jedoch die Herunterregulation der VEGF-A Expression in den mit Hyperoxie behandelten Gruppen sowie eine deutliche Heraufregulation von Nos2 und TNF $\alpha$  in den Versuchsgruppen mit maximaler Intervention.

Durch das PVL-Rattenmodell gelingt somit die Etablierung einer milden bis mäßigen retinalen Gefäßpathologie. Im Vergleich zu den teilweise übertriebenen Veränderungen reiner ROP-Modelle weist die vorliegende Arbeit einen besonders großen Bezug zur klinischen Situation auf, indem gerade die häufigen, mäßig schweren ROP Formen besonders gut wiedergespiegelt werden.

Der Einsatz neuroprotektiver und/oder vasoprotektiver Substanzen ist hier somit durchaus erfolgsversprechend und könnte in Zukunft vor allem Daten bezüglich einer Intervention gegen die verzögerte Gefäßmaturation liefern.

## 6. Summary

Within the work „Retinal vessel pathologies in a rat model for periventricular leukomalacia - a new model for retinopathy of prematurity in humans“, a rat model for periventricular leukomalacia was established in the frame of a research cooperation between Augenlinik Giessen und Kinderklinik Marburg. As PVL often occurs in combination with ROP, not only the brain of experimental animals was examined (by the Marburg group), but also the eyes. Analysis of both, brain and eyes, in the same animal experiment, might provide new and promising results, as until now there have only been animal models for PVL or ROP either.

Neonatal rat pups received unilateral ligation of the common carotid artery at P6 and were exposed to various hypoxic and/or hyperoxic conditions in four different groups. The animals` eyes were examined *in vivo* using fluorescein angiography and *post mortem* immunohistochemically and molecularbiologically at different time points.

A clear growth retardation and damage of the retinal vessel system was observed in experimental animals` eyes. This meant retardation in expansion of deep vascular plexus, retardation in final differentiation of vessel diameter, hypoxia/ischemia and/or hyperoxia induced variations in capillary formation and a distinct maturation delay of the entire vessel network. We could observe more or less mild changes in gene expression profiles, but downregulation of VEGF-A and upregulation of NOS-2 and TNF $\alpha$ , especially in experimental groups with the maximum of interventions, were remarkable.

We succeeded in establishing a mild to moderate retinal vessel pathology through the PVL rat model. Compared to partly exaggerated changes of mere ROP models, the current work features a particular reference to the clinical situation, where mild to moderate ROP forms occur even more than worst cases.

The use of neuroprotective and/or vasoprotective substances seems to be promising in this model and could even provide data regarding interventions against retarded vessel maturation.

## 7. Datenanhang

	P11						P21					
	A-L	A-R	B	C-L	C-R	D	A-L	A-R	B	C-L	C-R	D
Mittelwert [%]	39,74	52,98	47,58	45,00	50,29	54,15	87,67	100	100	88,67	100	100
Stabw	17,60	8,44	14,66	8,54	14,72	16,52	11,93	0	0	19,63	0	0

Tabelle 24: Relative Expansion des tiefen Gefäßplexus  
(Abbildung 39a)

	P11					P21				
	A-L	A-R	B	C-L	C-R	A-L	A-R	B	C-L	C-R
Mittelwert [%]	26,50	1,91	11,30	16,80	6,88	12,30	0	0	11,30	0
Stabw	17,60	8,44	14,66	8,54	14,72	11,93	0	0	19,63	0

Tabelle 25: Reduktion des tiefen Gefäßplexus  
(Abbildung 39b)

	A-L		A-R		B		C-L		C-R		D	
	flat	Kryo										
Mittelwert [µm]	2321	2282	1683	1750	1716	1729	1574	1615	1719	1750	1265	1301

Tabelle 26: Korrelation von flatmounts und Kryoschnitten  
(Abbildung 40d)

	Zentral					Mittlerer Peripherie				
	A-L	A-R	B	C-L	C-R	A-L	A-R	B	C-L	C-R
Mittelwert [%]	+2,80	+2,10	-9,50	-11,93	-8,66	+21,00	+3,10	-8,93	-0,61	+5,32
Stabw	9,96	6,20	6,63	6,52	3,60	3,04	4,22	3,96	2,87	4,54

Tabelle 27: Arterien Durchmesser, Abweichungen von Kontrollgruppe, P11  
(Abbildung 41a)

	Zentral					Mittlerer Peripherie				
	A-L	A-R	B	C-L	C-R	A-L	A-R	B	C-L	C-R
Mittelwert [%]	+61,33	+48,40	+10,16	+74,48	+33,98	+21,01	+17,52	+5,26	+9,18	+13,57
Stabw	12,40	9,56	4,58	7,08	6,62	2,35	2,26	3,43	7,13	1,92

Tabelle 28: Arterien Durchmesser, Abweichungen von Kontrollgruppe, P21  
(Abbildung 41b)

	A-L		A-R		B		C-L		C-R		D	
	P11	P21										
Mittelwert [µm]	43,02	51,90	42,70	47,74	37,85	35,44	36,84	56,13	38,25	43,10	41,83	32,19
Stabw	9,96	12,40	6,20	9,56	6,63	4,58	6,52	7,08	3,60	6,62	4,24	3,23

**Tabelle 29: Arterien­durchmesser, zeitl. Entwicklungsverlauf, zentrale Retina**

(z: zentral)

(Abbildung 42a)

	A-L		A-R		B		C-L		C-R		D	
	P11	P21										
Mittelwert [µm]	35,50	37,72	30,25	36,63	26,71	32,81	29,16	34,03	30,91	35,40	29,40	31,17
Stabw	3,04	2,35	4,22	2,26	3,96	3,43	2,87	7,13	4,54	1,92	2,75	2,79

**Tabelle 30: Arterien­durchmesser, zeitlicher Entwicklungsverlauf, mp Retina**

(mp: mitt-peripher)

(Abbildung 42b)

	A-L		A-R		B		C-L		C-R		D	
	z	mp										
Mittelwert [µm]	43,02	35,50	42,70	30,25	37,85	26,72	36,84	29,16	38,25	30,91	41,83	29,40
Stabw	9,96	3,04	6,20	4,22	6,63	3,40	6,52	2,87	3,60	4,54	4,24	2,75

**Tabelle 31: Arterien­durchmesser, räumlicher Entwicklungsverlauf, P11**

(z: zentral, mp: mitt-peripher), (Abbildung 43a)

	A-L		A-R		B		C-L		C-R		D	
	z	mp										
Mittelwert [µm]	51,90	37,72	47,74	36,63	35,44	32,81	56,13	34,03	43,10	35,40	32,17	31,17
Stabw	12,40	2,35	9,56	2,27	4,58	3,43	7,01	7,13	6,62	1,92	3,23	2,79

**Tabelle 32: Arterien­durchmesser, räumlicher Entwicklungsverlauf, P21**

(z: zentral, mp: mitt-peripher), (Abbildung 43b)

	A-L	A-R	B	C-L	C-R	D
Mittelwert	3,15	4,12	6,29	4,30	5,60	4,59
Stabw	0,57	1,52	1,00	0,34	1,99	0,28

**Tabelle 33: Quotient PGB/GD, P11**

(Abbildung 44)

	A-L	A-R	B	C-L	C-R	D
<b>Mittelwert</b>	177,77	85,38	95,63	117,80	104,00	75,23
<b>Stabw</b>	26,09	17,24	4,83	1,30	12,12	7,74

**Tabelle 34: Anzahl BP/1mm<sup>2</sup>, P11  
(Abbildung 45)**

		A-L	A-R	B	C-L	C-R
<b>P7</b>	<b>Fold Change</b>	0,71	0,64	1,17	0,92	0,84
	<b>Stabw</b>	0,08	0,24	0,40	0,06	0,07
<b>P11</b>	<b>Fold Change</b>	0,88	0,90	1,08	0,76	1,07
	<b>Stabw</b>	0,22	0,15	0,03	0,18	0,29
<b>P21</b>	<b>Fold Change</b>	0,80	0,89	0,99	1,02	1,22
	<b>Stabw</b>	0,12	0,17	0,21	0,41	0,31

**Tabelle 35: Fold Change Werte für HIF1 $\alpha$   
(Abbildung 54)**

		A-L	A-R	B	C-L	C-R
<b>P7</b>	<b>Fold Change</b>	1,02	0,91	0,37	0,64	0,37
	<b>Stabw</b>	0,42	0,26	0,09	0,27	0,36
<b>P11</b>	<b>Fold Change</b>	0,79	0,79	0,94	0,66	0,82
	<b>Stabw</b>	0,33	0,33	0,24	0,27	0,17
<b>P21</b>	<b>Fold Change</b>	0,93	1,29	1,24	1,11	0,74
	<b>Stabw</b>	0,48	0,35	0,22	0,44	0,68

**Tabelle 36: Fold Change Werte für VEGF  
(Abbildung 55)**

		A-L	A-R	B	C-L	C-R
P7	Fold Change	1,21	0,94	0,94	1,25	1,17
	Stabw	0,57	0,43	0,15	0,33	0,208
P11	Fold Change	1,03	0,91	0,82	0,93	0,908
	Stabw	0,22	0,17	0,12	0,35	0,18
P21	Fold Change	1,05	0,97	1,08	1,12	1,26
	Stabw	0,45	0,22	0,30	0,46	0,45

**Tabelle 37: Fold Change Werte für Epor  
(Abbildung 56)**

		A-L	A-R	B	C-L	C-R
P7	Fold Change	1,45	0,90	0,95	1,17	0,75
	Stabw	1,20	0,40	0,43	0,53	0,17
P11	Fold Change	1,40	0,99	1,03	1,01	1,35
	Stabw	0,53	0,52	0,23	0,38	1,09
P21	Fold Change	2,17	1,71	1,33	1,48	1,12
	Stabw	1,60	1,70	0,97	0,80	0,36

**Tabelle 38: Fold Change Werte für TNF $\alpha$   
(Abbildung 57)**

		A-L	A-R	B	C-L	C-R
P7	Fold Change	1,66	0,88	0,67	1,37	0,50
	Stabw	0,66	0,42	0,48	0,25	0,30
P11	Fold Change	1,17	1,66	1,32	0,72	0,77
	Stabw	0,79	0,93	0,51	0,29	0,40
P21	Fold Change	0,66	0,79	0,98	0,73	0,81
	Stabw	0,38	0,33	0,35	0,44	0,19

**Tabelle 39: Fold Change Werte für Nos2  
(Abbildung 58)**

## 8. Publikationen und Präsentationen

### Publikationen

Steck, J.; Blueml, C.; Kampmann, S.; Maier, RF; Arnhold, S., Gerstner, B; Lorenz, B.; Stieger, K.

**Retinal vessel pathologies in a rat model for periventricular leukomalacia – a new model for human retinopathy of prematurity?**

*- manuscript in preparation -*

### Präsentationen

Janina Steck, Carolin Blueml, Susanne Kampmann, Bettina Gerstner, Rolf F. Maier, Knut Stieger and Birgit Lorenz

**Retinal pathology reminiscent of retinopathy of prematurity in a rat model for periventricular leucomalacia**

ARVO Meeting Abstracts June 16, 2013 54:5562

## 9. Literaturverzeichnis

1. Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E., and Böhme, G., *Nervensystem, Sinnesorgane, endokrine Drüsen*, Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band 4, Parey Berlin, 2004
2. Dyer, M.A. and Cepko, C.L., *Regulating proliferation during retinal development*. Nat Rev Neurosci, 2001. 2(5): p. 333 - 42.
3. Ogishima, H., Nakamura, S., Nakanishi, T., Imai, S., Kakino, M., Ishizuka, F., Tsuruma, K., Shimazawa, M., and Hara, H., *Ligation of the pterygopalatine and external carotid arteries induces ischemic damage in the murine retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. 52(13): p. 9710-20.
4. Lelong, D.C., Bieche, I., Perez, E., Bigot, K., Leemput, J., Laurendeau, I., Vidaud, M., Jais, J.P., Menasche, M., and Abitbol, M., *Novel mouse model of monocular amaurosis fugax*. Stroke, 2007. 38(12): p. 3237-44.
5. Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E., and Habermehl, K.-H., *Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane*, Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band 3, Parey Berlin, 2005
6. Fruttiger, M., *Development of the retinal vasculature*. Angiogenesis, 2007. 10(2): p. 77-88.
7. Chen, L., Yang, P., and Kijlstra, A., *Distribution, markers, and functions of retinal microglia*. Ocul Immunol and Inflamm, 2002.
8. Santos, A.M., Calvente, R., Tassi, M., Carrasco, M.C., Martin-Oliva, D., Marin-Teva, J.L., Navascues, J., and Cuadros, M.A., *Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina*. J Comp Neurol, 2008. 506(2): p. 224-39.
9. Davies, M.H., Eubanks, J.P., and Powers, M.R., *Microglia and macrophages are increased in response to ischemia-induced retinopathy in the mouse retina*. Mol Vis, 2006.
10. Checchin, D., Sennlaub, F., Levavasseur, E., Leduc, M., and Chemtob, S., *Potential role of microglia in retinal blood vessel formation*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. 47(8): p. 3595-602.
11. Fletcher, E.L., Downie, L.E., Hatzopoulos, K., Vessey, K.A., Ward, M.M., Chow, C.L., Pianta, M.J., Vingrys, A.J., Kalloniatis, M., and Wilkinson-Berka, J.L., *The significance of neuronal and glial cell changes in the rat retina during oxygen-induced retinopathy*. Doc Ophthalmol, 2010. 120(1): p. 67-86.
12. Bringmann, A. and Wiedemann, P., *Müller glial cells in retinal disease*. Ophthalmologica, 2012. 227(1): p. 1-19.
13. Dorrell, M.I. and Friedlander, M., *Mechanisms of endothelial cell guidance and vascular patterning in the developing mouse retina*. Prog Retin Eye Res, 2006. 25(3): p. 277-95.
14. Fruttiger, M., *Development of the Mouse Retinal Vasculature: Angiogenesis Versus Vasculogenesis*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. 43: p. 522–527.
15. Stone, J. and Dreher, Z., *Relationship Between Astrocytes, Ganglion Cells and Vasculature of the Retina*. J Comp Neurol, 1987. 255(1): p. 35 - 49.
16. DeNiro, M., Al-Mohanna, F.H., and Al-Mohanna, F.A., *Inhibition of reactive gliosis prevents neovascular growth in the mouse model of oxygen-induced retinopathy*. PLoS One, 2011. 6(7): p. e22244.
17. Fruttiger, M., Calver, A.R., Krüger, W.H., Mudhar, H.S., Michalovich, D., Takakura, N., Nishikawa, S.I., and Richardson, W.D., *PDGF Mediates a Neuron–Astrocyte Interaction in the Developing Retina*. Neuron 1996. 17(6): p. 1117–1131.
18. West, H., Richardson, W.D., and Fruttiger, M., *Stabilization of the retinal vascular network by reciprocal feedback between blood vessels and astrocytes*. Development, 2005. 132(8): p. 1855-62.
19. Stone, J., Itin, A., Alon, T., Pe'er, J., Gnessin, H., Chan-Ling, H., and Keshet, E., *Development of Retinal Vasculature Is Mediated by Hypoxia-Induced Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression by Neuroglia*. J Neurosci, 1995. 17(7): p. 4738 - 4747.

20. Dorrell, M.I., Aguilar, E., Jacobson, R., Yanes, O., Gariano, R., Heckenlively, J., Banin, E., Ramirez, G.A., Gasmi, M., Bird, A., Siuzdak, G., and Friedlander, M., *Antioxidant or neurotrophic factor treatment preserves function in a mouse model of neovascularization-associated oxidative stress*. J Clin Invest, 2009. 119(3): p. 611-23.
21. Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M.S., Wildiers, H., Van Oosterom, A.T., and De Bruijn, E.A., *Vascular endothelial growth factor and angiogenesis*. Pharmacol Rev, 2004. 56(4): p. 549-80.
22. Heckmann, M., *Pathogenesis of retinopathy of prematurity*. Ophthalmologe, 2008. 105(12): p. 1101-7.
23. Caprara, C. and Grimm, C., *From oxygen to erythropoietin: relevance of hypoxia for retinal development, health and disease*. Prog Retin Eye Res, 2012. 31(1): p. 89-119.
24. Stahl, A., Connor, K.M., Sapieha, P., Chen, J., Dennison, R.J., Krahl, N.M., Seaward, M.R., Willett, K.L., Aderman, C.M., Guerin, K.I., Hua, J., Lofqvist, C., Hellstrom, A., and Smith, L.E., *The mouse retina as an angiogenesis model*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010. 51(6): p. 2813-26.
25. Henkind, P. and De Oliveira, L.F., *Development of retinal vessels in the rat*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1967. 6(5): p. 520-30.
26. Rohan, R.M., Fernandez, A., Udagawa, T., Yuan, J., and D'Amato, R.J., *Genetic heterogeneity of angiogenesis in mice*. FASEB J, 2000. 14(7): p. 871 - 876.
27. Chu, Y., Hughes, S., and Chan-Ling, T., *Differentiation and migration of astrocyte precursor cells (APCs) and astrocytes in human fetal retina: relevance to optic nerve coloboma*. FASEB J, 2001. 15(11): p. 2013 - 5.
28. Sainson, R.C., Johnston, D.A., Chu, H.C., Holderfield, M.T., Nakatsu, M.N., Crampton, S.P., Davis, J., Conn, E., and Hughes, C.C., *TNF primes endothelial cells for angiogenic sprouting by inducing a tip cell phenotype*. Blood, 2008. 111(10): p. 4997-5007.
29. Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., and Betsholtz, C., *VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia*. J Cell Biol, 2003. 161(6): p. 1163-77.
30. Gariano, R.F., Iruela-Arispe, M.L., and Hendrickson, A.E., *Vascular Development in Primate Retina: Comparison of Lamellar Plexus Formation in Monkey and Human*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994. 35(9): p. 3442-55.
31. Dorrell, M.I., Aguilar, E., and Friedlander, M., *Retinal Vascular Development Is Mediated by Endothelial Filopodia, a Preexisting Astrocytic Template and Specific R-Cadherin Adhesion*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. 43(11): p. 3500-3510.
32. Lobov, I.B., Renard, R.A., Papadopoulos, N., Gale, N.W., Thurston, G., Yancopoulos, G.D., and Wiegand, S.J., *Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(9): p. 3219-24.
33. Ishida, S., Yamashiro, K., Usui, T., Kaji, Y., Ogura, Y., Hida, T., Honda, Y., Oguchi, Y., and Adamis, A.P., *Leukocytes mediate retinal vascular remodelling during development and vaso-obliteration in disease*. Nat med, 2003. 9(6): p. 781 - 8.
34. Engerman, R.L. and Meyer, R.K., *Development of retinal vasculature in rats*. Am J Ophthalmol, 1965. 60(4): p. 628 - 41.
35. Hughes, S. and Chan-Ling, H., *Roles of endothelial cell migration and apoptosis in vascular remodeling during development of the central nervous system*. Microcirculation, 2000. 7(5): p. 317 - 33.
36. Claxton, S. and Fruttiger, M., *Role of arteries in oxygen induced vaso-obliteration*. Exp Eye Res, 2003. 77(3): p. 305-311.
37. Claxton, S. and Fruttiger, M., *Oxygen modifies artery differentiation and network morphogenesis in the retinal vasculature*. Dev Dyn, 2005. 233(3): p. 822-8.
38. Motiejunaite, R. and Kazlauskas, A., *Pericytes and ocular diseases*. Exp Eye Res, 2008. 86(2): p. 171-7.
39. Hellström, M., Kalén, M., Lindahl, P., Abramsson, A., and Betsholtz, C., *Role of PDGF-B and PDGFR-b in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes*

- during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*, 1999. 126(14): p. 3047 - 55.
40. Benjamin, L.E., Hemo, I., and Keshet, E., *A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF*. *Development*, 1998. 125: p. 1591-1598.
  41. Suri, C., Jones, P.F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P.C., Davis, S., Sato, T.N., and Yancopoulos, G.D., *Requisite Role of Angiopoietin-1, a Ligand for the TIE2 Receptor, during Embryonic Angiogenesis*. *Cell*, 1996. 87(7): p. 1171 - 80.
  42. Simonavicius, N., Ashenden, M., van Weverwijk, A., Lax, S., Huso, D.L., Buckley, C.D., Huijbers, I.J., Yarwood, H., and Isacke, C.M., *Pericytes promote selective vessel regression to regulate vascular patterning*. *Blood*, 2012. 120(7): p. 1516-27.
  43. Vargesson, N. and Laufer, E., *Smad7 misexpression during embryonic angiogenesis causes vascular dilation and malformations independently of vascular smooth muscle cell function*. *Dev Biol*, 2001. 240(2): p. 499-516.
  44. Ricard, N., Ciais, D., Levet, S., Subileau, M., Mallet, C., Zimmers, T.A., Lee, S.J., Bidart, M., Feige, J.J., and Bailly, S., *BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal vascular remodeling*. *Blood*, 2012. 119(25): p. 6162-71.
  45. Mahmoud, M., Allinson, K.R., Zhai, Z., Oakenfull, R., Ghandi, P., Adams, R.H., Fruttiger, M., and Arthur, H.M., *Pathogenesis of arteriovenous malformations in the absence of endoglin*. *Circ Res*, 2010. 106(8): p. 1425-33.
  46. Hughes, S., Yang, H., and Chan-Ling, T., *Vascularization of the Human Fetal Retina: Roles of Vasculogenesis and Angiogenesis*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000. 41(5): p. 1217 - 1228.
  47. Gariano, R.F., *Special features of human retinal angiogenesis*. *Eye (Lond)*, 2010. 24(3): p. 401-7.
  48. Kozulin, P., Natoli, R., Bumsted O'Brien, K.M., Madigan, M., and Provis, J.M., *Differential expression of anti-angiogenic factors and guidance genes in the developing macula*. *Mol Vis*, 2009. 15: p. 45 - 59.
  49. Weinberger, B., Laskin, D.L., Heck, D.E., and Laskin, J.D., *Oxygen toxicity in premature infants*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2002. 181(1): p. 60-7.
  50. Ashton, N., *Retinal Angiogenesis In The Human Embryo*. *Br Med Bull*, 1970. 26(2): p. 103 - 6.
  51. Hasegawa, T., McLeod, D.S., Prow, T., Merges, C., Grebe, R., and Lutty, G.A., *Vascular precursors in developing human retina*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008. 49(5): p. 2178-92.
  52. Chan-Ling, T., *Astrocyte-Endothelial Cell Relationships during Human Retinal Vascular Development*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004. 45(6): p. 2020-2032.
  53. Gariano, R.F., Sage, E.H., Kaplan, H., and Hendrickson, A.E., *Development of Astrocytes and Their Relation to Blood Vessels in Fetal Monkey Retina*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996. 37(12): p. 2367 - 75.
  54. Smith, L.E., Wesolowski, E., McLellan, A., Kostyk, S.K., D'Amato, R., Sullivan, R., and D'Amore, P.A., *Oxygen-Induced Retinopathy in the Mouse*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994(35): p. 101-111.
  55. Fleck, B.W. and McIntosh, N., *Pathogenesis of retinopathy of prematurity and possible preventive strategies*. *Early Hum Dev*, 2008. 84(2): p. 83-8.
  56. Terry, T.L., *Extreme prematurity and fibroplastic overgrowth of persistent vascular sheath behind each crystal-line lens. I. Preliminary report*. *Am J Ophthalmol*, 1942. 25: p. 203 - 4.
  57. Chen, J. and Smith, L.E., *Retinopathy of prematurity*. *Angiogenesis*, 2007. 10(2): p. 133-40.
  58. Obladen, M., Maier, R. F. and Barthlen, W., *Neugeborenen-Intensivmedizin: Evidenz und Erfahrung*, Springer Berlin Heidelberg, 2006
  59. Ashton, N., Ward, B., and Serpell, G., *Effect of Oxygen On The Developing Retinal Vessels With Particular Reference To The Problem Of Retrolental Fibroplasia*. *Br J Ophthalmol*, 1954. 38(7): p. 397 - 432.

60. Patz, A., Eastham, H., Higginbotham, D.H., and Kleh, T., *Oxygen studies in retrolental fibroplasia. II. The production of the microscopic changes of retrolental fibroplasia in experimental animals.* Am J Ophthalmol, 1953. 36(11): p. 1511 - 22.
61. Patz, A., *The role of oxygen in retrolental fibroplasia.* Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1968. 195(2): p. 77 - 85.
62. Jorch, G. and Arenz, S., *Neonatologie: Die Medizin des Früh- und Reifgeborenen,* Thieme Stuttgart, 2010
63. Hartnett, M.E., *The effects of oxygen stresses on the development of features of severe retinopathy of prematurity: knowledge from the 50/10 OIR model.* Doc Ophthalmol, 2010. 120(1): p. 25-39.
64. Pelken, L. and Maier, R.F., *Risk factors and prevention of retinopathy of prematurity.* Ophthalmologie, 2008. 105(12): p. 1108-13.
65. Lorenz, B., *Aktuelle augenärztliche Aspekte der akuten Retinopathia praematurorum.* Ophthalmologie, 2008. 105(12): p. 1092-100.
66. Jandeck, C., Kellner, U., and Foerster, M.H., *Retinopathy of prematurity.* Klin Monbl Augenheilkd, 2004. 221(3): p. 147-59.
67. Tin, W., Milligan, D.W., Pennefather, P., and Hey, E., *Pulse oximetry, severe retinopathy, and outcome at one year in babies of less than 28 weeks gestation.* Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition, 2001. 84(2): p. F106 - 10.
68. Stone, J., Chan-Ling, T., Pe'er, J., Itin, A., Gnessin, H., and Keshet, E., *Roles of vascular endothelial growth factor and astrocyte degeneration in the genesis of retinopathy of prematurity.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996. 37(2): p. 290 - 9.
69. Rivera, J.C., Sapieha, P., Joyal, J.S., Duhamel, F., Shao, Z., Sitaras, N., Picard, E., Zhou, E., Lachapelle, P., and Chemtob, S., *Understanding retinopathy of prematurity: update on pathogenesis.* Neonatology, 2011. 100(4): p. 343-53.
70. Appelbaum, A., *Retrolental Fibroplasia.* California Medicine, 1952. 77(4): p. 259 - 65.
71. Prematurity, I.C.f.t.C.o.R.o., *The International Classification of Retinopathy of Prematurity revisited.* Arch Ophthalmol, 2005. 123(7): p. 991 - 9.
72. Intensivmedizin, G.f.N.u.P., *Augenärztliche Screening-Untersuchungen von Frühgeborenen.* AWMF Leitlinien, 2010.
73. Jandeck, C., Kellner, U., Lorenz, B., and Seiberth, V., *Leitlinie zur augenaerztlichen Screening-Untersuchung von Frühgeborenen.* Ophthalmologie, 2008. 105(10): p. 955-63.
74. Mintz-Hittner, H.A., Kennedy, K.A., and Chuang, A.Z., *Efficacy of Intravitreal Bevacizumab for Stage 3+ Retinopathy of Prematurity.* N Engl J Med, 2011. 364(7): p. 603–615.
75. Jandeck, C., Kellner, U., Heimann, H., and Foerster, M.H., *Koagulationstherapie bei Frühgeborenenretinopathie.* Ophthalmologie, 2005. 102(1): p. 33-8.
76. Mutlu, F.M. and Sarici, S.U., *Treatment of retinopathy of prematurity: a review of conventional and promising new therapeutic options.* Int J Ophthalmol, 2013. 6(2): p. 228-36.
77. Autrata, R., Krejcirova, I., Senkova, K., Holousova, M., Dolezel, Z., and Borek, I., *Intravitreal pegaptanib combined with diode laser therapy for stage 3+ retinopathy of prematurity in zone I and posterior zone II.* Eur J Ophthalmol, 2012. 22(5): p. 687-94.
78. Lorenz, B., *Bevacizumab bei RPM?* Klin Monbl Augenheilkd, 2011. 228: p. 488 - 490.
79. Lorenz, B., Neutzner, R., Andrassi-Darida, M., Wenner, Y., Hubert, M., Repp, R., and Jäger, M., *Einsatz von Anti-VEGF bei der akuten Frühgeborenenretinopathie.* Der Augenspiegel, 2011. 32(5).
80. Krohne, T.U., Eter, N., Holz, F.G., and Meyer, C.H., *Intraocular pharmacokinetics of bevacizumab after a single intravitreal injection in humans.* Am J Ophthalmol, 2008. 146(4): p. 508-12.
81. Gyllensten, L.J. and Hellstrom, B.E., *Experimental approach to the pathogenesis of retrolental fibroplasia I: Changes of the eye induced by exposure of newborn mice to concern rated oxygen.* Acta Paediatr Suppl., 1954. 43(100): p. 131 - 48.

82. Gole, G.A., Browning, J., and Elts, S.M., *The mouse model of oxygen-induced retinopathy: A suitable animal model for angiogenesis research*. Doc Ophthalmol., 1990. 74(3): p. 163 - 169.
83. Downie, L.E., Pianta, M.J., Vingrys, A.J., Wilkinson-Berka, J.L., and Fletcher, E.L., *AT1 receptor inhibition prevents astrocyte degeneration and restores vascular growth in oxygen-induced retinopathy*. Glia, 2008. 56(10): p. 1076-90.
84. Dorrell, M.I., Aguilar, E., Jacobson, R., Trauger, S.A., Friedlander, J., Siuzdak, G., and Friedlander, M., *Maintaining retinal astrocytes normalizes revascularization and prevents vascular pathology associated with oxygen-induced retinopathy*. Glia, 2010. 58(1): p. 43-54.
85. Del Maestro, R., Thaw, H.H., Björk, J., Planker, M., and Arfors, K.E., *Free radicals as mediators of tissue injury*. Acta Physiol Scand Suppl., 1980. 492(43 - 57).
86. Frank, L. and Sosenko, I.R., *Failure of premature rabbits to increase antioxidant enzymes during hyperoxic exposure: increased susceptibility to pulmonary oxygen toxicity compared with term rabbits*. Pediatr Res, 1991. 29(3): p. 292 - 6.
87. Scott, A. and Fruttiger, M., *Oxygen-induced retinopathy: a model for vascular pathology in the retina*. Eye (Lond), 2010. 24(3): p. 416-21.
88. Sato, T., Kusaka, S., Hashida, N., Saishin, Y., Fujikado, T., and Tano, Y., *Comprehensive gene-expression profile in murine oxygen-induced retinopathy*. Br J Ophthalmol, 2009. 93(1): p. 96-103.
89. Watanabe, D., Suzuma, K., Matsui, S., Kurimoto, M., Kiryu, J., Kita, M., Suzuma, I., Ohashi, H., Ojima, T., Murakami, T., Kobayashi, T., Masuda, S., Nagao, M., Yoshimura, N., and Takagi, H., *Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy*. N Engl J Med, 2005. 353(8): p. 782 - 92.
90. Naug, H.L., Browning, J., Gole, G.A., and Gobé, G., *Vitreous macrophages express vascular endothelial growth factor in oxygen-induced retinopathy*. Clin Experiment Ophthalmol, 2000. Feb;28(1):48-52
91. Yamaji, R., Okada, T., Moriya, M., Naito, M., Tsuruo, T., Miyatake, K., and Nakano, Y., *Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA*. Eur J Biochem, 1996. 239(2): p. 494 - 500.
92. Angagnostou, A., Liu, Z., Steiner, M., Chin, K., Lee, E.S., Kessimian, N., and Noguchi, C.T., *Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994. 91(9): p. 3974-3978.
93. Wu, J.H., Gao, Y., Ren, A.J., Zhong, M., and Liu, L., *Erythropoietin receptor antibody inhibits oxidative stress induced retinal neovascularization in mice*. Int J Ophthalmol, 2011. 4(3): p. 243-6.
94. Chen, J., Connor, K.M., Aderman, C.M., and Smith, L.E., *Erythropoietin deficiency decreases vascular stability in mice*. J Clin Invest, 2008. 118(2): p. 526-33.
95. He, T., Ai, M., Zhao, X.H., and Xing, Y.Q., *Inducible nitric oxide synthase mediates hypoxia-induced hypoxia-inducible factor-1 alpha activation and vascular endothelial growth factor expression in oxygen-induced retinopathy*. Pathobiology, 2007. 74(6): p. 336-43.
96. Sennlaub, F., Courtois, Y., and Goureau, O., *Inducible Nitric Oxide Synthase Mediates Retinal Apoptosis in Ischemic Proliferative Retinopathy*. J Neurosci., 2002. 22(10): p. 3987-93
97. Beauchamp, M.H., Sennlaub, F., Speranza, G., Gobeil, F., Jr., Checchin, D., Kermorvant-Duchemin, E., Abran, D., Hardy, P., Lachapelle, P., Varma, D.R., and Chemtob, S., *Redox-dependent effects of nitric oxide on microvascular integrity in oxygen-induced retinopathy*. Free Radic Biol Med, 2004. 37(11): p. 1885-94.
98. Gu, X., El-Remessy, A.B., Brooks, S.E., Al-Shabrawey, M., Tsai, N.T., and Caldwell, R.B., *Hyperoxia induces retinal vascular endothelial cell apoptosis through formation of peroxynitrite*. American journal of physiology. Cell Physiol., 2003. 285(3): p. 546 - 54.
99. Downie, L.E., Pianta, M.J., Vingrys, A.J., Wilkinson-Berka, J.L., and Fletcher, E.L., *Neuronal and glial cell changes are determined by retinal vascularization in retinopathy of prematurity*. J Comp Neurol, 2007. 504(4): p. 404-17.

100. Otani, A., Takagi, H., Suzuma, K., and Honda, Y., *Angiotensin II Potentiates Vascular Endothelial Growth Factor Induced Angiogenic Activity in Retinal Microcapillary Endothelial Cells*. *Circ Res*, 1998. 82(5): p. 619-628.
101. Patz, A., *Oxygen studies in retrolental fibroplasia IV. Clinical and experimental observations*. *Am J Ophthalmol*, 1954. 38: p. 291 - 308.
102. Barnett, J.M., Yanni, S.E., and Penn, J.S., *The development of the rat model of retinopathy of prematurity*. *Doc Ophthalmol*, 2010. 120(1): p. 3-12.
103. Saito, Y., Omoto, T., Cho, Y., Hatsukawa, Y., Fujimura, M., and Takeuchi, T., *The progression of retinopathy of prematurity and fluctuation in blood gas tension*. *Graefes Archive Clin Exp Ophthalmol*, 1993. 231(3): p. 151 - 6.
104. Cunningham, S., Fleck, B.W., Elton, R.A., and McIntosh, N., *Transcutaneous oxygen levels in retinopathy of prematurity*. *Lancet*, 1995. 346(8988): p. 1464-5.
105. Penn, J.S., Tolman, B.L., and Lowery, L.A., *Variable oxygen exposure causes preretinal neovascularization in the newborn rat*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1993. 34(3): p. 576 - 85.
106. Penn, J.S., Henry, M.M., Wall, P.T., and Tolman, B.L., *The range of PaO<sub>2</sub> variation determines the severity of oxygen-induced retinopathy in newborn rats*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995. 36(10): p. 2063 - 70.
107. Penn, J.S., Henry, M.M., and Tolman, B.L., *Exposure to Alternating Hypoxia and Hyperoxia Causes Severe Proliferative Retinopathy in the Newborn Rat*. *Pediatr Res*, 1994. 36(6): p. 724-731.
108. Kermorvant-Duchemin, E., Sapieha, P., Sirinyan, M., Beauchamp, M., Checchin, D., Hardy, P., Sennlaub, F., Lachapelle, P., and Chemtob, S., *Understanding ischemic retinopathies: emerging concepts from oxygen-induced retinopathy*. *Doc Ophthalmol*, 2010. 120(1): p. 51-60.
109. Budd, S.J. and Hartnett, M.E., *Increased Angiogenic Factors Associated With Peripheral Avascular Retina and Intravitreal Neovascularization*. *Arch Ophthalmol.*, 2010. 128 (5): p. 589-595.
110. McColm, J.R., Geisen, P., and Hartnett, M.E., *VEGF isoforms and their expression after a single episode of hypoxia or repeated fluctuations between hyperoxia and hypoxia: relevance to clinical ROP*. *Mol Vis*, 2004. 10: p. 512 - 20.
111. Dawson, D.W., *Pigment Epithelium-Derived Factor: A Potent Inhibitor of Angiogenesis*. *Science*, 1999. 285(5425): p. 245-248.
112. Gao, G., Li, Y., Zhang, D., Gee, S., Crosson, C., and Ma, J., *Unbalanced expression of VEGF and PEDF in ischemia-induced retinal neovascularization*. *FEBS Lett*, 2001. 489(2-3): p. 270-6.
113. Zhang, S.X., Wang, J.J., Gao, G., Parke, K., and Ma, J.X., *Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy*. *J Mol Endocrinol.*, 2006. 37(1): p. 1-12.
114. Chan-Ling, T., Halasz, P., and Stone, J., *Development of retinal vasculature in the cat: processes and mechanisms*. *Curr Eye Res*, 1990. 9(5).
115. Kremer, I., Kissun, R., Nissenkorn, I., Ben-Sira, I., and Garnerf, A., *Oxygen-Induced Retinopathy in Newborn Kittens*. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 1986.
116. Chan-Ling, T., Tout, S., Holländer, H., and Stone, J., *Vascular changes and their mechanisms in the feline model of retinopathy of prematurity*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1992. 33(7): p. 2128 - 47.
117. Flower, R.W., McLeod, D.S., Lutty, G.A., Goldberg, B., and Wajer, S.D., *Postnatal retinal vascular development of the puppy*. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 1985. 26(7): p. 957 - 68.
118. McLeod, D.S., Brownstein, R., and Lutty, G.A., *Vaso-Obliteration in the Canine Model of Oxygen-Induced Retinopathy*. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 1996(37): p. 300-311.
119. McLeod, D.S., Crone, S.N., and Lutty, G.A., *Vasoproliferation in the Neonatal Dog Model of Oxygen-Induced Retinopathy*. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 1996. 37(7): p. 1322 - 1333.

120. McLeod, D.S., D'Anna, S.A., and Luty, G.A., *Clinical and histopathologic features of canine oxygen-induced proliferative retinopathy*. Invest Ophthalmol Vis Sci., 1998. 39(10): p. 1918 - 32.
121. Volpe, J.J., *Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant*. Pediatr Res., 2001. 50(5): p. 553-62.
122. Ajayi-Obe, M., Saeed, N., Cowan, F.M., Rutherford, M.A., and Edwards, A.D., *Reduced development of cerebral cortex in extremely preterm infants*. The Lancet, 2000. 356(9236): p. 1162-1163.
123. Nosarti, C., Al-Asady, M.H., Frangou, S., Stewart, A.L., Rifkin, L., and Murray, R.M., *Adolescents who were born very preterm have decreased brain volumes*. Brain, 2002. 125(Pt 7): p. 1616-23.
124. Felderhoff-Mueser, U., Bittigau, P., Sifringer, M., Jarosz, B., Korobowicz, E., Mahler, L., Piening, T., Moysich, A., Grune, T., Thor, F., Heumann, R., Buhner, C., and Ikonomidou, C., *Oxygen causes cell death in the developing brain*. Neurobiol Dis., 2004. 17(2): p. 273-82.
125. Dobbing, J. and Sands, J., *Comparative aspects of the brain growth spurt*. Early Hum Dev., 1979. 3(1): p. 79-83.
126. Khwaja, O. and Volpe, J.J., *Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed., 2008. 93(2): p. F153-61.
127. Jelinski, S.E., Yager, J.Y., and Juurlink, B.H., *Preferential injury of oligodendroblasts by a short hypoxic-ischemic insult*. Brain Res., 1999. 815(1): p. 150-3.
128. Uehara, H., Yoshioka, H., Kawase, S., Nagai, H., Ohmae, T., Hasegawa, K., and Sawada, T., *A new model of white matter injury in neonatal rats with bilateral carotid artery occlusion*. Brain Res., 1999. 837(1-2): p. 213-20.
129. Matsuda, T., Okuyama, K., Cho, K., Hoshi, N., Matsumoto, Y., Kobayashi, Y., and Fujimoto, S., *Induction of antenatal periventricular leukomalacia by hemorrhagic hypotension in the chronically instrumented fetal sheep*. Am J Obstet Gynecol, 1999. 181(3): p. 725-30.
130. Tagliatela, G., Perez-Polo, J.R., and Rassin, D.K., *Induction of apoptosis in the CNS during development by the combination of hyperoxia and inhibition of glutathione synthesis*. Free Radic Biol Med., 1998. 25(8): p. 936-42.
131. Levison, S.W. and Goldman, J.E., *Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain*. Neuron, 1993. 10(2): p. 201-12.
132. Gerstner, B., Buhner, C., Rheinlander, C., Polley, O., Schuller, A., Berns, M., Obladen, M., and Felderhoff-Mueser, U., *Maturation-dependent oligodendrocyte apoptosis caused by hyperoxia*. J Neurosci Res., 2006. 84(2): p. 306-15.
133. Gerstner, B., DeSilva, T.M., Genz, K., Armstrong, A., Brehmer, F., Neve, R.L., Felderhoff-Mueser, U., Volpe, J.J., and Rosenberg, P.A., *Hyperoxia causes maturation-dependent cell death in the developing white matter*. J Neurosci, 2008. 28(5): p. 1236-45.
134. Neil, J., Miller, J., Mukherjee, P., and Huppi, P.S., *Diffusion tensor imaging of normal and injured developing human brain - a technical review*. NMR Biomed, 2002. 15(7-8): p. 543-52.
135. Leijser, L.M., Liauw, L., Veen, S., de Boer, I.P., Walther, F.J., and van Wezel-Meijler, G., *Comparing brain white matter on sequential cranial ultrasound and MRI in very preterm infants*. Neuroradiology, 2008. 50(9): p. 799-811.
136. Soria-Pastor, S., Gimenez, M., Narberhaus, A., Falcon, C., Botet, F., Bargallo, N., Mercader, J.M., and Junque, C., *Patterns of cerebral white matter damage and cognitive impairment in adolescents born very preterm*. Int J Dev Neurosci., 2008. 26(7): p. 647-54.
137. Horbar, J.D., Carpenter, J.H., Badger, G.J., Kenny, M.J., Soll, R.F., Morrow, K.A., and Buzas, J.S., *Mortality and neonatal morbidity among infants 501 to 1500 grams from 2000 to 2009*. Pediatrics, 2012. 129(6): p. 1019-26.
138. Gerstner, B., Sifringer, M., Dzierko, M., Schuller, A., Lee, J., Simons, S., Obladen, M., Volpe, J.J., Rosenberg, P.A., and Felderhoff-Mueser, U., *Estradiol attenuates*

- hyperoxia-induced cell death in the developing white matter.* Ann Neurol., 2007. 61(6): p. 562-73.
139. Gerstner, B., Lee, J., DeSilva, T.M., Jensen, F.E., Volpe, J.J., and Rosenberg, P.A., *17beta-estradiol protects against hypoxic/ischemic white matter damage in the neonatal rat brain.* J Neurosci Res, 2009. 87(9): p. 2078-86.
  140. Rabie, T. and Marti, H.H., *Brain protection by erythropoietin: a manifold task.* Physiology (Bethesda), 2008. 23: p. 263-74.
  141. Masahiro, S., Wen, T., Matsuda, S., Masuda, S., Morishita, E., Nagao, M., and Sasaki, R., *In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998.
  142. Nagasunder, A.C., Kinney, H.C., Bluml, S., Tavare, C.J., Rosser, T., Gilles, F.H., Nelson, M.D., and Panigrahy, A., *Abnormal microstructure of the atrophic thalamus in preterm survivors with periventricular leukomalacia.* AJNR Am J Neuroradiol, 2011. 32(1): p. 185-91.
  143. Chidlow, G., Holman, M.C., Wood, J.P.M., and Casson, R.J., *Spatiotemporal Characterization of Optic Nerve Degeneration after Chronic Hypoperfusion in the Rat.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. 51(3): p. 1483 - 97.
  144. Erhardt, W., *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier : sowie bei Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen,* Schattauer Stuttgart, 2004
  145. Diehl, K.H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J.M., van de Vorstenbosch, C., Association, E.F.o.P.I., and Methods, E.C.f.t.V.o.A., *A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes.* J Appl Tox, 2001. 21(1): p. 15 - 23.
  146. Dithmar, S., and Holz, F.G., *Fluorescence Angiography in Ophthalmology,* Springer Berlin Heidelberg, 2008
  147. Renshaw, S., *Immunohistochemistry,* Scion Publ. Bloxham, 2007
  148. Ernst, C. and Christie, B.R., *Isolectin-IB 4 as a vascular stain for the study of adult neurogenesis.* J Neurosci Methods, 2006. 150(1): p. 138-42.
  149. Ozerdem, U., Grako, K.A., Dahlin-Huppe, K., Monosov, E., and Stallcup, W.B., *NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis.* Dev Dyn, 2001. 222(2): p. 218-27.
  150. Rehm, H. *Der Experimentator: Proteinbiochemie, Proteomics,* Spektrum Heidelberg, 2000
  151. Mühlhardt, C., *Der Experimentator: Molekularbiologie,* Spektrum Heidelberg, 2006
  152. Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., and Wittwer, C.T., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.* Clin Chem, 2009. 55(4): p. 611-22.
  153. Holzapfel, B. and Wickert, L., *Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete.* Biologie in unserer Zeit, 2007. 37(2): p. 120-126.
  154. Van Wijngaarden, P., Brereton, H.M., Coster, D.J., and Williams, K.A., *Stability of housekeeping gene expression in the rat retina during exposure to cyclic hyperoxia.* Mol Vis., 2007.
  155. Pfaffl, M.W., *Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung.* BIOSpektrum, 2004.
  156. Fau, S., Po, C., Gillet, B., Sizonenko, S., Mariani, J., Meric, P., and Charriaut-Marlangue, C., *Effect of the reperfusion after cerebral ischemia in neonatal rats using MRI monitoring.* Exp Neurol, 2007. 208(2): p. 297-304.
  157. Sirinyan, M., Sennlaub, F., Dorfman, A., Sapieha, P., Gobeil, F., Jr., Hardy, P., Lachapelle, P., and Chemtob, S., *Hyperoxic exposure leads to nitrative stress and ensuing microvascular degeneration and diminished brain mass and function in the immature subject.* Stroke, 2006. 37(11): p. 2807-15.
  158. Hardy, P., Peri, K.G., Lahaie, I., Varma, D.R., and Chemtob, S., *Increased nitric oxide synthesis and action preclude choroidal vasoconstriction to hyperoxia in newborn pigs.* Circ Res, 1996. 79(3): p. 504 - 11.

159. Sears, J.E., Hoppe, G., Ebrahim, Q., and Anand-Apte, B., *Prolyl hydroxylase inhibition during hyperoxia prevents oxygen-induced retinopathy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(50): p. 19898-903.
160. Aiello, L.P., Pierce, E.A., Foley, E.D., Takagi, H., Helen, C., Riddle, L., Ferrara, N., King, G., and Smith, L.E., *Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995. 92(23): p. 10457-10461.
161. Riva, M., Pappada, G.B., Papadakis, M., Cuccione, E., Carone, D., Menendez, V.R., Sganzerla, E.P., and Beretta, S., *Hemodynamic monitoring of intracranial collateral flow predicts tissue and functional outcome in experimental ischemic stroke*. Exp Neurol, 2012. 233(2): p. 815-20.
162. Nakamura, A., Wakugawa, Y., Yasaka, M., Ogata, T., Yasumori, K., Kitazono, T., and Okada, Y., *Antegrade internal carotid artery collateral flow and cerebral blood flow in patients with common carotid artery occlusion*. J Ultrasound Med, 2012. 31(10): p. 1561-6.
163. Akula, J.D., Favazza, T.L., Mocko, J.A., Benador, I.Y., Asturias, A.L., Kleinman, M.S., Hansen, R.M., and Fulton, A.B., *The anatomy of the rat eye with oxygen-induced retinopathy*. Doc Ophthalmol, 2010. 120(1): p. 41-50.
164. Cunningham, S., McColm, J.R., Wade, J., Sedowofia, K., McIntosh, N., and Fleck, B., *A novel model of retinopathy of prematurity simulating preterm oxygen variability in the rat*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. 41(13): p. 4275-80.
165. Eltzschig, H.K. and Collard, C.D., *Vascular ischaemia and reperfusion injury*. Br Med Bull, 2004. 70: p. 71-86.
166. Conci, E., Pachinger, O., and Metzler, B., *Mouse Models for Myocardial Ischaemia/Reperfusion*. Austrian Journal of Cardiology, 2006. 13(7-8): p. 239 - 244.
167. Berger, S., Savitz, S.I., Nijhawan, S., Singh, M., David, J., Rosenbaum, P.S., and Rosenbaum, D.M., *Deleterious role of TNF-alpha in retinal ischemia-reperfusion injury*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. 49(8): p. 3605-10.
168. Kubes, *Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us*. Gut, 2000(47): p. 6-9.
169. Zheng, L., Gong, B., Hatala, D.A., and Kern, T.S., *Retinal ischemia and reperfusion causes capillary degeneration: similarities to diabetes*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. 48(1): p. 361-7.
170. Huang, H.M., Lin, S.A., Chang, Y.C., and Kuo, H.K., *Correlation between periventricular leukomalacia and retinopathy of prematurity*. Eur J Ophthalmol, 2012. 22(6): p. 980-984.
171. Yang, C.S., Wang, A.G., Sung, C.S., Hsu, W.M., Lee, F.L., and Lee, S.M., *Long-term visual outcomes of laser-treated threshold retinopathy of prematurity: a study of refractive status at 7 years*. Eye (Lond), 2010. 24(1): p. 14-20.

## 10. Danksagung

Frau Prof. Dr. Birgit Lorenz danke ich für die großartige Projektidee und die Überlassung des Themas. Außerdem für die Bereitstellung der Finanzierung durch die von Behring-Röntgen Stiftung, die fachliche Betreuung und dass ich die Dissertation im Labor ihrer Klinik anfertigen durfte.

Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold danke ich für die veterinärmedizinische Betreuung meiner Dissertation, seine Hilfsbereitschaft und das rege Interesse an meinem Projekt.

Weiterhin danke ich meinem Betreuer im Labor für molekulare Ophthalmologie, Herrn PD Dr. Dr. Knut Stieger, der stets ein offenes Ohr und einen Lösungsvorschlag für meine Fragen und Probleme hatte.

Mein Dank gilt außerdem den Kooperationspartnern der Kinderklinik Marburg, Herrn Prof. Dr. Rolf Maier, Frau Dr. Susanne Kampmann und Frau Carolin Blüml für die gute Zusammenarbeit, die Organisation der Laborräume und die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen.

Allen Mitarbeitern des Labors für molekulare Ophthalmologie möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken, die Unterstützung in technischen Fragen und dafür, dass auch der Spaß nie zu kurz kam.

Mein besonderer Dank gilt Carolin Blüml, die das Projekt von Anfang an mit mir zusammen betreut, die Tierexperimente so hervorragend organisiert hat und mit der ich sowohl durch erfolgreiche als auch schwierige Zeiten gegangen bin. Ohne Dich wäre das alles nicht möglich gewesen!

Außerdem möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern bedanken, denn Ihr habt durch Eure jahrelange Unterstützung, das Mitfiebern während Studium und Doktorarbeit und Euer Interesse diese Zeit sehr viel wertvoller für mich gemacht.

Einen großen Dank möchte ich auch meiner Kollegin und guten Freundin Doro aussprechen, mit der ich zusammen durch die Höhen und Tiefen des Doktorand-Seins gegangen bin. Du warst mir immer die beste Beraterin und Mitleidende.

Von ganzem Herzen danken möchte ich meinem Freund Marten für sein unendliches Verständnis und seinen Rückhalt über all die Jahre. Mit Dir an meiner Seite fiel und fällt mir alles so viel leichter.

## **11. Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Janina Steck

Gießen, den 12. Februar 2014



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6163-0



9 17 8 3 8 3 5 19 6 1 6 3 0 1

