

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. N. Eter

**Der Effekt des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems auf kultivierte, humane
Retinaendothelzellen und laserinduzierte choroidale Neovaskularisationen im Auge**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Rohloff, Nadine
aus Frechen/Erftkreis

2019

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. N. Eter

**Der Effekt des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems auf kultivierte, humane
Retinaendothelzellen und laserinduzierte choroidale Neovaskularisationen im Auge**

INAUGURAL – DISSERTATION

ZUR

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Rohloff, Nadine
aus Frechen/Erftkreis

2019

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Herrmann

1. Berichterstatterin: Univ.-Prof. Dr. N. Eter
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. H. Pavenstädt

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Mai 2020

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. N. Eter –

Referent:

Korreferent:

ZUSAMMENFASSUNG

Der Effekt des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems auf kultivierte, humane Retinaendothelzellen und laser-induzierte choroidale Neovaskularisationen im Auge
Nadine Rohloff

Die Altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist der häufigste Grund für Erblindung im Sinne des Gesetzes der älteren Bevölkerung der westlichen Industrienationen (122, 184). Besonders die exsudative Spätform mit choroidalen Neovaskularisationen (CNV) zeigt oft schwerwiegende Verläufe (122). Die Pathophysiologie der AMD umfasst unter anderem angiogene Prozesse, Beeinträchtigungen der Blut-Retina-Schranke (BRS) sowie oxidativen Stress. Der Einfluss von Aldosteron und Spironolacton auf jedes dieser pathophysiologischen Systeme ist für einige retinalen Erkrankungen wie der diabetischen Retinopathie nachgewiesen worden. Diese Arbeit soll den Einfluss auf CNV bei AMD beleuchten.

C56/BL5J Mäuse mit laserinduzierter CNV erhielten je nach Gruppe Aldosteron, Spironolacton oder Vehikellösung und wurden nach drei oder vierzehn Tagen mittels optischer Kohärenztomographie (OCT) und Fluoreszenzangiographie (FAG) untersucht. Eingriffe in die Proteinexpression wurden durch immunhistochemische Färbungen der Netzhäute dargestellt. Der Einfluss von Aldosteron und Spironolacton auf die Proliferation kultivierter humaner retinaler Endothelzellen (hREZ) ohne Behandlung und unter oxidativem Stress konnte durchflusszytometrisch ermittelt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass Aldosteron die retinale Dicke kurzfristig und die Größe der CNV längerfristig erhöht. Spironolacton dagegen vermindert das Volumen der CNV im Vergleich zur Kontrolle um 27%. In der FAG wurde die Leckage durch Aldosteron tendenziell gefördert und durch Spironolacton erniedrigt. Dies könnte durch die Beeinflussung der BRS erklärt werden. Unter Aldosteroneinfluss zeigten sich qualitativ verminderte Claudin-5- und VE-Cadherin-Expressionen. Durch Aldosteron wurden vimentinpositive Zellen im Laserherd sowie vascular endothelial growth factor (VEGF) vermehrt exprimiert und durch Spironolacton vermindert. Aldosteron fördert die Progression der CNV, schädigt die BRS durch verminderte Expression wichtiger Strukturproteine sowie durch vermehrte Expression des permeabilitätssteigernden und proangiogenen VEGF. Die gesteigerte Vimentin-Expression könnte Anzeichen einer Fibrosierung oder Aktivierung endothelialer Vorläuferzellen sein. Aldosteron wirkte zudem proliferationsfördernd auf hREZ unter oxidativem Stress während Spironolacton synergistisch mit dem oxidativen Stress die Proliferation hemmte.

Mineralkortikoid-Rezeptor-Antagonismus inhibiert die laserinduzierte CNV, die VEGF- und Vimentin-Expression und bietet daher neue Therapieansätze für CNV bei AMD.

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Mai 2020

ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

**Der Effekt des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems auf kultivierte,
humane Retinaendothelzellen und laserinduzierte
choroidale Neovaskularisationen im Auge**

in der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

Universitätsklinikum Münster Klinik für Augenheilkunde

unter der Anleitung von:

Frau Prof. Nicole Eter und Frau Dr. med. Alex

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Ort, Datum

Name/ Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Anatomische und physiologische Grundlagen	1
1.1.1	Die Retina.....	2
1.1.2	Die Bruchsche Membran – Lamina vitrea	4
1.1.3	Die Choroidea	4
1.1.4	Angiogenese	5
1.1.5	Das Blut-Retina-Barrieren-System	6
1.1.5.1	Allgemeine Funktionsweise	6
1.1.5.2	Feinstruktur der Tight-Junctions und Adherens Junctions.....	9
1.2	Altersabhängige Makuladegeneration	12
1.2.1	Definition, Epidemiologie und klinische Einteilung.....	12
1.2.2	Diagnostik	13
1.2.3	Therapie der Frühstadien und der trockenen AMD	13
1.2.4	Exsudative „feuchte“ AMD	14
1.2.5	Choroidale Neovaskularisation	15
1.2.5.1	Einteilung der choroidalen Neovaskularisation.....	15
1.2.5.2	Pathogenese der choroidalen Neovaskularisation bei AMD	17
1.2.6	Mausmodell der CNV bei AMD	20
1.2.7	Therapieansätze der exsudativen Makuladegeneration.....	21
1.2.7.1	VEGF-Inhibitoren.....	21
1.2.7.2	Placental-Growth-Faktor	22
1.2.7.3	Experimentelle Therapieansätze.....	22
1.3	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.....	23
1.3.1	Definition	23
1.3.2	Aldosteron und Spironolacton.....	24
1.3.3	Intraretinales RAAS	25
1.4	Zielsetzung der Arbeit	27
2	Material und Methoden.....	29
2.1	Mausmodell der Laserinduzierten Neovaskularisation	29
2.1.1	Material	30

2.1.2	Versuchstiere und Genehmigung	30
2.1.3	Versuchsaufbau	30
2.1.4	Laserbehandlung	31
2.2	In Vivo Imaging.....	33
2.2.1	Optische Kohärenztomographie	33
2.2.2	Fluoreszenzangiographie.....	35
2.2.3	Statistische Auswertung	37
2.3	Immunhistochemische Methoden.....	37
2.3.1	Material	37
2.3.2	E nukleation.....	38
2.3.3	Herstellung von Paraffinschnitten.....	38
2.3.4	Immunfluoreszenzfärbung	39
2.3.5	Statistische Methoden	41
2.4	Zellbiologische Methoden	41
2.4.1	Material	41
2.4.2	Zellkultivierung.....	41
2.4.3	Versuchsansatz.....	42
2.4.4	CFSE-Färbung.....	43
2.4.5	APC-Beads	45
2.4.6	Hoechst-Färbung	45
2.4.7	Durchflusszytometrie	46
2.4.8	Statistische Auswertung	46
3	Ergebnisse.....	48
3.1	Optische Kohärenztomographie – Strukturelle Einflüsse auf die Retina	48
3.1.1	Der Einfluss auf die zentrale Retinadicke	48
3.1.2	Laserherddurchmesser.....	50
3.1.3	Zeitliche Dynamik der Laserherddurchmesser	51
3.1.4	Einfluss auf das Volumen der choroidale Neovaskularisation.....	52
3.2	Fluoreszenzangiographie	54
3.2.1	Laserherdgröße.....	54
3.2.2	Der Einfluss auf Leckage - Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI)	55
3.2.3	Verhältnis MFI zu Pixelanzahl.....	58

3.3	Immunhistochemie	59
3.3.1	Angiogenese und Inflammation – Isolektin B4 und VEGF	59
3.3.1.1	Isolektin B4	59
3.3.1.2	VEGF	60
3.3.2	Einfluss auf Tight- und Adherens Junctions	62
3.3.2.1	Claudin 5	62
3.3.2.2	ZO-1	65
3.3.2.3	VE-Cadherin.....	66
3.3.3	Einfluss auf den Stoffaustausch (Vimentin, AQP-4, GLUT-1)	67
3.3.3.1	Vimentin	67
3.3.3.2	Aquaporin 4	69
3.3.3.3	GLUT-1	70
3.4	Humane Retinaendothelzellen	71
3.4.1	Einfluss von DMSO auf das Experiment	71
3.4.2	Wirkung von Aldosteron und Spironolacton auf Proliferation und Vitalität der Endothelzellen.....	71
3.4.2.1	Gesamte Zellzahl	71
3.4.2.2	Lebende Zellen	71
3.4.2.3	Tote Zellen.....	72
3.4.2.4	Proliferationszyklen.....	74
3.4.3	H ₂ O ₂ – oxidativer Stress	75
3.4.3.1	Antiproliferative Wirkung des oxidativen Stresses.....	75
3.4.3.2	Zellpopulationen.....	76
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	81
3.5.1	Optische Kohärenztomographie	81
3.5.2	Fluoreszenzangiographie.....	81
3.5.3	Immunhistochemie	82
3.5.4	Humane Retinaendothelzellen.....	85
3.5.5	Humane Retinaendothelzellen und oxidativer Stress.....	86
4	Diskussion.....	88
4.1	Einfluss auf klinische Retina- und Laserherdmorphologie	88
4.1.1	Zentrale Dicke	88

4.1.2 CNV-Größe	90
4.1.3 LH-Ausdehnung	90
4.1.4 Zusammenfassende Einordnung	91
4.1.5 Methodenkritik und mögliche Fehlerquellen	91
4.2 Einfluss auf Blut-Retina-Schranke	93
4.2.1 Leckage in der FAG	93
4.2.2 Einfluss auf Tight und Adherens Junctions.....	94
4.2.3 Einfluss auf den Stoffaustausch – AQP-4, Vimentin, GLUT-1	98
4.2.4 Zusammenfassende Einordnung	101
4.2.5 Methodenkritik und mögliche Fehlerquellen	101
4.3 Einfluss auf Angiogenese und oxidativen Stress.....	103
4.3.1 Proliferationsverhalten von Endothelzellen	103
4.3.2 VEGF und Isolektin	104
4.3.3 Einfluss von H ₂ O ₂ und Aldosteron/Spironolacton auf Endothelzellen...	107
4.3.4 Zusammenfassende Einordnung	108
4.3.5 Methodenkritik und mögliche Fehlerquellen	109
4.4 Zusammenfassung und Fazit – Wie wirkt das RAAS bei choroidaler Neovaskularisation?.....	110
4.5 Neue Therapiemöglichkeiten durch MR-Antagonismus	111
4.6 Weiterer Forschungsbedarf.....	112
5 Abbildungsverzeichnis.....	114
6 Tabellenverzeichnis	119
7 Abkürzungsverzeichnis.....	121
8 Literaturverzeichnis	124
9 Lebenslauf.....	143
10 Anhang.....	I
10.1 Tabellen zu Material und Methoden.....	I
10.2 Zusammenfassung der In Vivo Ergebnisse	XIX
10.3 Tierversuchsgenehmigung	XXII

1 Einleitung

Bereits seit mehreren Jahrhunderten stellt die altersabhängige Makuladegeneration (AMD), besonders die exsudative AMD mit choroidalen Neovaskularisationen (CNV), die häufigste Ursache für Erblindung im Sinne des Gesetzes der älteren kaukasischen Bevölkerung dar (184).

Und auch Jahrzehnte später hat sich an dieser Tatsache nichts verändert (122). Der negative Einfluss, den die AMD auf die Lebensqualität der Betroffenen durch den zentralen Visusverlust hat, ist vergleichbar mit dem einer schweren systemischen Erkrankung wie Krebs oder eines Herzinfarktes (185).

Trotz vieler diagnostischer und therapeutischer Fortschritte liegen immer noch keine suffizienten Präventions- oder Therapiestrategien vor. Im Gegenteil - der demographische Wandel lässt die Prävalenz und Inzidenz weiter steigen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), im Besonderen mit dem Einfluss von Aldosteron und seinem Antagonisten Spironolacton auf den Verlauf der exsudativen AMD mit CNV. Anhand eines Mausmodells und mithilfe kultivierter retinaler Endothelzellen sollen pathophysiologische Grundlagen der Aldosteronwirkung entschlüsselt werden, um Ansatzpunkte für die Therapie der CNV bei AMD mit Aldosteronantagonisten zu schaffen.

1.1 Anatomische und physiologische Grundlagen

Für das Verständnis der Pathologien ist auch die Anatomie relevant (siehe Abbildung 1). Choroidale Neovaskularisationen (CNV) sind Pathologien des posterioren Augenabschnittes. Dieser umfasst den Glaskörper, die Retina, die Choroidea sowie die Bruchsche Membran. Im weiteren Verlauf wird ein Überblick über die zum Verständnis relevante Anatomie und Physiologie gegeben.

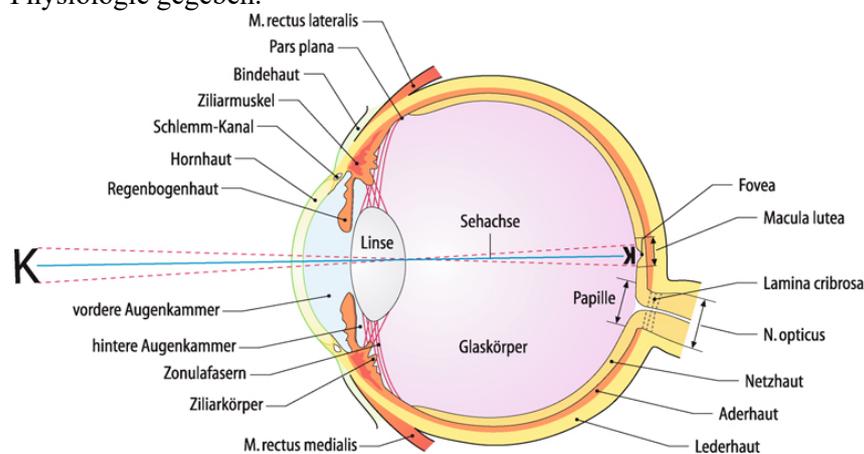


Abbildung 1 Die Anatomie des Auges (80)

1.1.1 Die Retina

Die Retina kann aufgrund ihrer embryologischen Entwicklung und Funktion als Teil des Gehirns betrachtet werden.

Sie ist in histologisch gut erkennbaren Schichten aufgebaut und wird nach außen von der Bruchschen Membran sowie nach innen vom Glaskörper begrenzt.

Die äußerste Schicht bildet das retinale Pigmentepithel (RPE). Seine Aufgabe besteht vor allem im Abbau der abgestoßenen Scheibchen der daran grenzenden Photorezeptorschicht. Die Photorezeptoren unterteilen sich in Stäbchen und Zapfen und sind heterogen über die Retina verteilt. Ihre Kerne bilden die äußere Körnerschicht. Dabei befinden sich die Stäbchen in ihrer Funktion des Dämmerungs- und Nachtsehens eher peripher, während die für die Farbwahrnehmung verantwortlichen Zäpfchen vornehmlich im Zentrum vertreten sind. Im Punkt des schärfsten Sehens, der Fovea centralis in der Makula lutea, befinden sich ausschließlich Zapfen. In dieser Region finden sich in der Regel die Pathologien der Altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) (80).

Von den Photorezeptoren werden die Lichtsignale über die Synapsen der äußeren plexiformen Schicht an Neurone, die bipolaren Zellen weitergegeben, deren Zellkerne in der inneren Körnerschicht liegen. Anschließend gelangen die Reize über die Synapsen der inneren plexiformen Schicht an die Ganglienzellen, deren Axone diese zentral über den Sehnerv ans Gehirn weiterleiten (80).

Wichtige Stützzellen, die Müllerzellen (MZ), befinden sich ubiquitär in der Retina und durchziehen diese vertikal. Die Fortsätze der MZ bilden die innere und äußere Grenzmembran (Membrana limitans interna und externa). Die innere Grenzmembran über den Ganglienzellen besteht aus den Endfortsätzen der MZ sowie einer Basalmembran und grenzt die Retina zum Glaskörper ab. Die äußere Grenzmembran wird ebenfalls aus Fortsätzen der MZ gebildet und siebartig von den Photorezeptoren durchbrochen (siehe Abbildung 2 und Abbildung 3) (10). Ihnen kommt eine besondere Aufgabe im Rahmen der Elektrolyt- und Ionenverteilung zu (80).

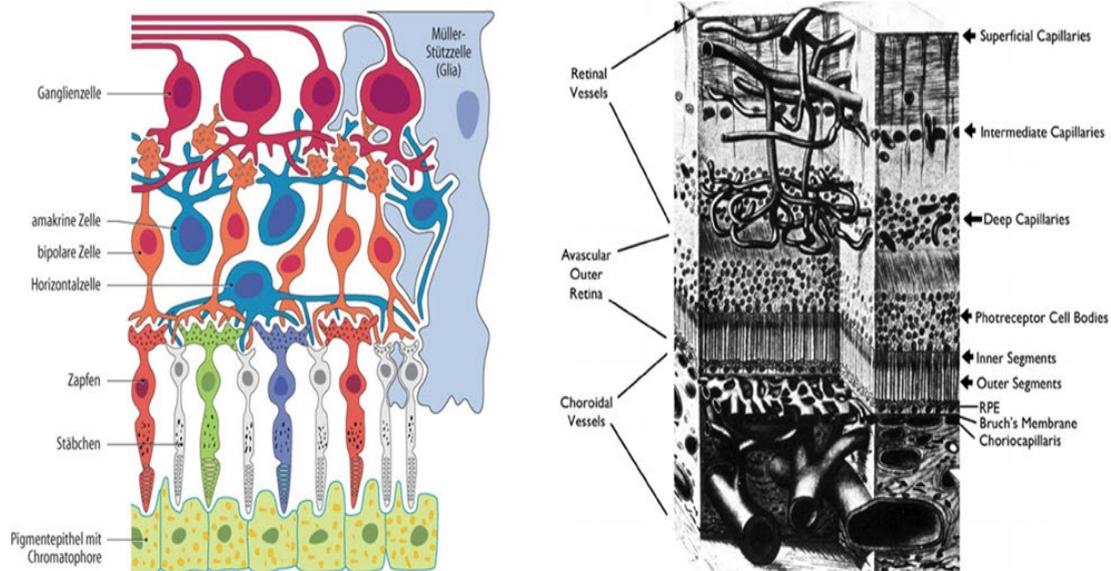


Abbildung 2 Links: Schematischer Aufbau der Retina (80), Rechts: Gefäßversorgung der Retina (29)

Retinale Gefäße entspringen aus der Arteria centralis retinae, welche zunächst zusammen mit dem Sehnerv verläuft, bevor sie sich in die Netzhautarteriolen verzweigt. Der venöse Transport erfolgt analog in Netzhautvenolen die sich an der Papille zur Zentralvene vereinigen. Über dieses Gefäßsystem werden die inneren Netzhautschichten – Nervenfasern, Ganglienzellen und die innere Körnerschicht – versorgt. Die Versorgung der periphereren Schichten und der Photorezeptoren erfolgt über die Lamina choriocapillaris aus den Ziliararterien. Der venöse Rückstrom ist in Vortexvenen organisiert (80).

Die Retina hat einen hohen Energieverbrauch der analog zum Gehirn durch Glucose gedeckt wird. Glucose passiert die humane Blut-Retina-Schranke durch die Glucose-Transporter (GLUT) 1 und 3. GLUT-1 ist der dominierende Glucose-Transporter des Auges und wird u.a. an der apikalen und basolateralen Oberfläche des RPE, an den Plasmamembranen der MZ, sowie mit verminderter Expression an den äußeren Segmenten der Photorezeptoren exprimiert. Im retinalen Gefäßendothel konnte der Transporter nur minimal nachgewiesen werden, im fenestrierten Endothel des Choroids fehlt er gänzlich (118).

Der GLUT-1 Transporter ist ebenfalls für den Transport von Vitamin C in Form von Dehydroabietic acid (DHAA), einem Antioxidans, über die Blut-Retina-Schranke, verantwortlich (167).

1.1.2 Die Bruchsche Membran – Lamina vitrea

Die Bruchsche Membran wird allgemein bereits als Teil der Choroidea angesehen, ist aber funktionell eine 2 µm messende Barriere zwischen Retina und Choroidea. Sie setzt sich aus fünf Schichten zusammen. Innen bildet die Basalmembran des RPE die Grenze zur Retina. Darauf folgen quergestreifte Kollagenfasern und nicht quergestreifte sowie lichtmikroskopisch sichtbare elastische Fasern. Nach außen bilden eine weitere quergestreifte Kollagenfaserschicht sowie die Basalmembran der Choriokapillaris den Abschluss der Bruchschens Membran (108).

An die Basalmembran der Choriokapillaris schließt sich das fenestrierte Endothel an (108). Die Bruchsche Membran bildet eine Diffusionsbarriere für große Moleküle, kleine Moleküle wie Fluorescein oder Ferritin können sie jedoch frei passieren (156).

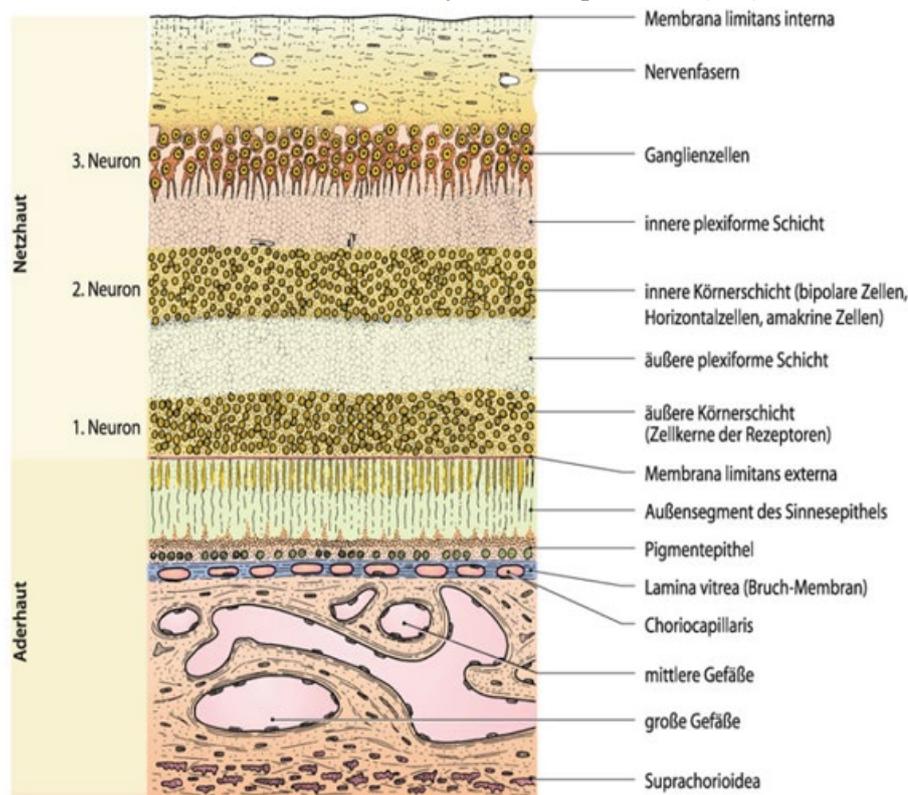


Abbildung 3 Retina, Lamina vitrea und Choroidea (80)

1.1.3 Die Choroidea

Die Choroidea ist mehrschichtig, wobei die erste und damit innerste Schicht die bereits erwähnte Bruchsche Membran darstellt.

Daran grenzt die Lamina Choriokapillaris, ein Kapillargeflecht mit fenestriertem Endothel und vielfachen Anastomosen (80). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen dünne, vielfach fenestrierte Endothelzellen, umfasst mit einer sehr dünnen Basalmembran mit geringer

Elektronendichte. Damit handelt es sich um Gefäße mit einer sehr hohen Permeabilität (42). Über dieses Gefäßgeflecht findet auch die Versorgung des RPE und der Photorezeptoren statt. Aufgrund der Fenestrierung der Choriokapillaris sind keine Glucosetransporter zur Diffusionserleichterung notwendig (118).

Entstehen durch Degeneration oder anderweitige Schädigungen des RPE und der Bruchschichten Membran Defekte in der Barriere zwischen Choroidea und Retina können die fenestrierten Kapillaren über die Choroidea hinaus in die Retina proliferieren.

Hierauf folgt die Lamina vasculosa, welches ein großes Venengeflecht beinhaltet.

Durch den großen Blutstrom reguliert die Choroidea die Temperatur des Auges.

Die Aderhaut ist nicht sensibel innerviert, sodass Pathologien in der Regel schmerzfrei verlaufen (80).

1.1.4 Angiogenese

Physiologische Gefäßneubildung kann als Vaskulogenese oder Angiogenese ablaufen. Vaskulogenese beschreibt dabei die embryonale Gefäßneubildung aus mesodermalen Vorläufern (16). Angiogenese dagegen bildet neue Gefäße durch Aussprossen aus vorhandenen Gefäßen, anschließende Anastomosierung und Pruning (141). Die Entstehung neovaskulärer Gefäße im Erwachsenen lässt sich der Angiogenese zuordnen. Beide Prozesse, die Angiogenese und die Vaskulogenese, werden von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und seinen Rezeptoren beeinflusst (157).

Die Angiogenese kann schematisch in drei Schritte eingeteilt werden.

1. **Aussprossung:** Eine Zelle wird zur „Tip-Zelle“ Von dieser Zelle geht das neu gebildete Gefäß aus. Der Gefäßspross wird durch Zellteilung und Elongation der Nachbarzellen in Richtung der „Tip-Zelle“ verlängert, deren Weg durch Chemotaxis und anatomische Gegebenheiten geleitet wird. Anschließend wird ein Lumen gebildet, welches den Spross mit dem ursprünglichen Gefäß verbindet. In anderen Fällen wird das Gefäß erst nach der Anastomosierung lumenisiert (16).
2. **Anastomosierung:** Das neue Gefäß anastomosiert mit anderen Aussprossungen und bereits vorhandenen Gefäßen zu einem Netzwerk (16).
3. **Pruning:** Das so entstandene Netzwerk wird zum Schluss erneut strukturiert und remodeliert. Die Endothelzellen kleinerer Gefäße werden einfach in größere Gefäße integriert, andere gehen in die Apoptose (16).

Die Angiogenese wird durch ein Gleichgewicht aus pro- und antiangiogenen Mediatoren gesteuert. Proangiogene Mediatoren sind VEGF, Placental Growth Factor (PlGF), Transforming Growth Factor (TGF)- α and - β , fibroblast growth factor und Angiopoietin-1 and -2 (63, 64, 109, 145).

Antagonistisch wirken dagegen Pigmentepithelium Derived Factor (PEDF), Thrombospondin, Angiostatin und Endostatin (63).

1.1.5 Das Blut-Retina-Barrieren-System

1.1.5.1 Allgemeine Funktionsweise

Die Retina wird von einem System aus Barrieren vor unkontrolliertem Stoffaustausch mit dem Blutgefäßsystem geschützt. Die Blut-Retina-Schranke (BRS) wird dabei ergänzt von weniger effizienten ziliären Barrieren und dem iridialen Endothel – der Blut-Kammerwasser-Schranke – welche den Stoffaustausch des Kammerwassers mit dem Blut begrenzt. Zusammen bilden Sie die Blut-Augen-Barrieren. Zwischen dem Kammerwasser, Glaskörper und der Retina kann ungehinderte Diffusion stattfinden, sodass die Blut-Augen-Barrieren zusammen die Retina, den Extrazellulären Raum der Retina und das Kammerwasser vom Kreislaufsystem separieren (41). Die Blut-Kammerwasser-Schranke hat auf die Pathologie der CNV höchstens einen marginalen Einfluss, sodass auf eine weitere Beschreibung verzichtet werden kann.

Die BRS wird unterteilt in einen äußeren und inneren Teil. Die innere BRS wird durch das Endothel der retinalen Gefäße gebildet, die äußere BRS durch das RPE.

Die breiten retinalen Endothelzellen sind genauso wie zerebrale Endothelzellen durch "non-leaky" Tight Junctions vor unkontrolliertem parazellulärem Stoffaustausch geschützt (40). Diese „non-leaky“ Tight Junctions werden durch dichte interzelluläre junktionale Komplexe – zonulae occludentes – gebildet, welche die Endothelzellen miteinander zu einer epithelähnlichen Struktur verbinden. Zudem umgibt eine breite Basalmembran das retinale Endothel (42).

Aktiver bidirektionaler Transport zwischen apikaler und basaler Seite der Retinaendothelzellen wird durch sogenannte Caveolae gewährleistet. Die Funktionsweise dieser lipidreichen Einbuchtungen der Plasmamembran - Lipid Rafts – ist noch nicht vollständig entschlüsselt. Vermutet wird einer von zwei Mechanismen: entweder sie lösen sich als Transportmittel von der Zellemembran um die Substanzen auf die gegenüberliegende Seite zu bringen, oder sie bilden durch Fusion temporäre Kanäle durch die Zelle (114).

Das RPE bildet die äußere Barriere zwischen Retina und Blutgefäßsystem, nämlich zwischen Choriokapillaris und Retina. Die Bruchsche Membran verhindert nur die Diffusion großer Moleküle, kleinere Moleküle wie Fluoreszein oder Ferritin können sie mühelos passieren. Damit unterbricht erst das RPE den Stoffaustausch zwischen Retina und den fenestrierten Kapillaren des Choroids. Ebenso wie die retinalen Endothelzellen bilden die RPE-Zellen zonulae occludentes aus, sind also durch „non-leaky“-Tight Junctions miteinander verbunden (156).

Diese Barrieren ermöglichen die Aufrechterhaltung der Homöostase der Retina. Elektrolytkonzentrationsgradienten können durch non-leaky Tight-Junctions zwischen zwei Bereichen aufgebaut und aufrechterhalten werden. Zudem wird der Stoffaustausch von Molekülen aller Größen auf aktiven und passiven Transport durch die Zellmembranen beschränkt und reguliert (156). Lipophile Substanzen können Zellmembranen und damit die Blut-Retina-Schranke gut passiv passieren, während mit Abnahme der Lipophilie auch der passive Transport erschwert wird (18).

Die BRS verhindert die Aufnahme neurotoxischer oder gewebschädigender Moleküle, ihre Aufgabe ist es aber auch Metaboliten zu entfernen um die Homöostase aufrecht zu erhalten. Zum Schutz der Retina findet ein aktiver Transport von neurotoxischen und gewebschädigenden Substanzen, z.B. Prostaglandinen oder organische Anionen, aus dem Bereich der Retina über die BRS statt (40).

MZ sind retinale Gliazellen, die funktionell besonders mit den Bipolaren Zellen verbunden sind. Durch ihre anatomische Ausdehnung über alle Bereiche der Retina und retinale Gefäße sind ihre Aufgaben nicht auf die Neuroprotektion beschränkt. Sie bilden die anatomische Verbindung zwischen der Neuroretina und dem RPE und können auch den Molekültransport zwischen diesen beiden regulieren. Im Gesamtzusammenhang bilden sie damit über das RPE eine Verbindung zu den choroidalen Gefäßen (25).

MZ haben einen großen Anteil an der Barrierefunktion der retinalen Blutgefäße, der inneren BRS (169). Wie die Astrozyten des Zentrales-Nerven-Systems (ZNS) induzieren sie Barriereigenschaften an Blutgefäßen, z. B. an intraretinalen Gefäßen. Dabei ist der Mechanismus von anderen Astrozyten an anderen Geweben übertragbar. Auch die MZ der avaskulären Retina können diese Funktion in Kontakt mit vaskulärem Gewebe aktivieren. MZ sind ein großer Faktor in der Entstehung und Aufrechterhaltung der Blut-Retina-Schranke (169).

Unter physiologischen Bedingungen sezernieren die MZ den antiangiogenen Faktor PEDF (52).

Besonders der Wasser- und Elektrolythaushalt wird durch MZ beeinflusst. Sie besitzen zahlreiche Transportproteine wie den Kaliumkanal Kir.4, α -Epithelial Natrium Channel (EnaC) Kanäle und Wasserporen, die Aquaporine (AQP) (25). Auch unter physiologischen Bedingungen kommt es zur Ansammlung von Wasser in der Retina. Diese Dehydratation wird durch das RPE, sowie durch die MZ (von den vitrealen zu den paravaskulären Ausläufern in die Gefäße) mit ihren Aquaporinen vorgenommen (26).

Das wichtigste AQP der Retina ist AQP-4, welches sowohl in MZ als auch im RPE vorhanden ist (25). AQP-4 ist stark an perivaskulären und paravitrealen Membrananteilen der MZ exprimiert, sowie an allen Membrananteilen die Synapsen in den plexiformen Schichten ummanteln (26). Eine Zelladhäsive Wirkung oder Beteiligung an Zell-Zell-Kontakten von AQP-4 wird zurzeit diskutiert (5, 53).

Immunhistochemisch können Müller-Zellen besonders durch Anfärbung der hauptsächlich auf MZ exprimierten Proteine Vimentin und AQP-4 sichtbar gemacht werden (146).

Nahezu alle retinalen Erkrankungen resultieren aus oder gehen mit einer Beschädigung der BRS einher. Defekte können mithilfe der Fluoreszenzangiographie (FAG) und der optischen Kohärenztomographie (OCT) detektiert werden (40).

1.1.5.2 Feinstruktur der Tight-Junctions und Adherens Junctions

"Non-leaky" Tight Junctions sind definiert als Zellverbindungen, die so dicht sind, dass der transzelluläre Stofftransport weniger Widerstand bietet als der parazelluläre (154).

Zwei benachbarte Zellen bilden eine Zonula Occludens durch Fusion der äußeren Blätter ihrer Zellmembran über 0,2-0,5 µm und verhindern damit die unkontrollierte Diffusion zwischen apikaler und basaler Gewebeschicht. Dabei umgibt die Tight-Junction die Zelle als Netzwerk linearer Fibrillen (59). Die Zonula occludens (ZO) wird von vielen verschiedenen Transmembranproteinen der benachbarten Zellen gebildet. Die Zusammensetzung der Transmembranproteine hat direkten Einfluss auf die Permeabilität der Zellschicht. Eine wichtige Rolle spielen Occludine, Claudine und Junctionale Adhäsionsmoleküle (JAM). Die Verbindung zwischen den Transmembranproteinen und dem Zytoplasma wird durch ZO-Proteine gebildet (87).

Occludin wird hauptsächlich in Endothel-, Epithel- und dendritischen Zellen exprimiert (69, 148). Es interagiert mit zahlreichen Transmembranproteinen und regulatorischen Proteinen. Der Zell-Zell-Kontakt wird dabei von zwei extrazellulären Schleifen des Occludin hergestellt (69). Die Verbindung mit Zonula Occludens Protein 1 (ZO-1) bildet eine notwendige Verbindung mit dem Zytoskelett. Die Expressionsrate von Occludin korreliert mit der Qualität der Barrierefunktion, die Anwesenheit von Occludin ist allerdings nicht essentiell für die Ausbildung von Tight Junctions (TJ) (87).

Durch VEGF-Einfluss wird Occludin phosphoryliert wodurch die Permeabilität der BRS verstärkt wird (86).

Claudine sind eine Familie von Transmembranproteinen mit 4 Transmembrandomänen und einer dem Occludin ähnliche Struktur. Sie haben maßgeblichen Einfluss auf die Bildung der Tight-Junctions (126). Einige Claudine, wie Claudin-1,5 und 8, stärken die Adhäsions- und Barrierefunktion, andere Claudine, beispielsweise Claudin-2 und Claudin-10, greifen durch Bildung von spezifischen parazellulären Ionenkanälen in die Elektrolythomöostase ein und erhöhen die Permeabilität (5).

Je nach Gewebetyp werden verschiedene Claudine exprimiert. In Endothelzellen lassen sich vor allem Claudin-1, Claudin-5 sowie Claudin 15 nachweisen (126).

Claudin-5 ist eines der dominantesten TJ-Proteine in Endothelzellen und hat einen starken Einfluss auf die Permeabilität der BRS. Eine vermehrte Expression von Claudin-5 in humanen Retinaendothelzellen (hRECs) führte über eine erhöhte Claudin-1 sowie eine verminderten Claudin-2 Expression zu einer verbesserten Barrierefunktion der hRECs. Eine vermehrte

Claudin-5 Expression resultiert in einer Verbesserung der Barrierefunktion der inneren BRS. Im RPE, der äußeren BRS, ist kein Claudin-5 vorhanden (166). Stattdessen konnten Claudin-3, Claudin-10 und Claudin-19 als wichtige Proteine der TJ zwischen RPE-Zellen nachgewiesen werden (137).

Die Strukturen der Adherens und Tight Junctions sind in Abbildung 4 illustriert.

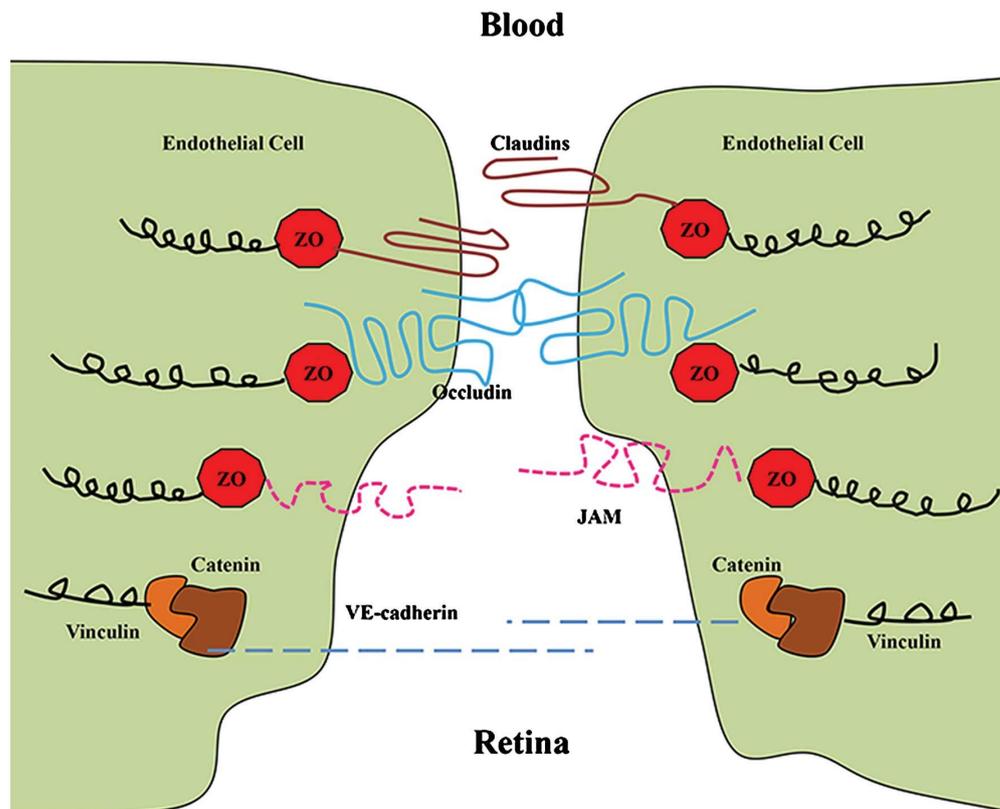


Abbildung 4 Tight Junction und Adherens Junction (35)

ZO-Proteine sind membranassoziierte periphere Proteine die zum zytoplasmatischen Plaque der TJs gehören. Sie bilden die Verbindung zwischen den Transmembranproteinen, dem Zytoskelett und zytoplasmatischen Plaques der beteiligten endothelialen und epithelialen Zellen (93). Da die vielfältigen Domänen der ZO-Proteine mit vielen zellulären und transmembranösen Proteinen interagieren, kommt Ihnen eine zentrale strukturelle Rolle im Aufbau der TJ zu (87).

Im RPE reguliert ZO-1 in Interaktion mit dem ZO1-associated nucleic acid binding protein (ZONAB) die Proliferation der RPE-Zellen. Eine verminderte Expression von ZO-1 resultiert in vermehrter Proliferation, aber auch Dysfunktion der RPE-Zellen. Es konnten Strukturveränderungen mit Monolayerabbrüchen und Debrisanhäufung, sowie funktionelle Ausfälle der BRS mit vermehrter Leckage in der FAG gezeigt werden (76).

TJs und Adherens Junctions (AJs) interagieren miteinander. In Epithelzellen finden sich TJs meist apikal der Adherens-Junction, in Endothelzellen sind AJs und TJs miteinander verwoben (siehe Abbildung 4) (43). Veränderungen in den AJs haben immer auch einen Effekt auf die TJ-Verbindungen und umgekehrt (133).

Transmembranproteine, sog. **Cadherine**, fungieren als Zelladhäsionsmoleküle, die das Schlüsselmolekül der AJ bilden sowie eine große Rolle in der interzellulären Erkennung und Interaktion einnehmen. VE-Cadherin ist ein endothelspezifisches Cadherin, welches die Permeabilität der Gefäße sowie die Zell-Zell-Kontakte beeinflusst (106). Über γ -, β - und α -Catenin ist Vascular Endothelial-Cadherin (VE-Cadherin) mit dem Zytoskelett verbunden (78).

VE-Cadherin moduliert durch Phosphorylierung und Komplexbildung die Wirkung von VEGF am VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR-2). Bei bestehenden Zell-Zell-Kontakten mit VE-Cadherin in AJs aktiviert VEGF über VEGFR-2 den Phosphoinositid 3 (PI3)-Kinase Weg als Überlebenssignal. Bei verminderter oder fehlender VE-Cadherin Expression oder Endothelzellen außerhalb eines Zellverbundes wird über VEGFR-2 die Proliferation und das Wachstum über die (Mitogen-Activated Protein) MAP-Kinase angeregt. Damit ist VE-Cadherin ein wichtiger Faktor für die Ausbildung organisierter vaskulärer Strukturen und verantwortlich für die Kontaktinhibition der Proliferation (105).

VEGF wiederum steigert die Permeabilität der Endothelien durch Phosphorylierung der VE-Cadherin-Catenin-Komplexe bzw. kurzfristige Endozytose von VE-Cadherin und damit verbundener Schwächung der Verbindung. Dadurch werden die AJs und TJs desorganisiert, in ihrer Barrierefunktion geschwächt und die Permeabilität der Endothelzellen-Schicht gesteigert. VEGF führt damit wahrscheinlich zu einer Lösung der AJs und damit ebenfalls zur Inhibition der Zellkontaktinhibition des Wachstums der Endothelzellen (43).

Ein Mangel an funktionell verfügbarem VE-Cadherin, sei es durch mangelnde Expression oder Inaktivierung durch Phosphorylierung bzw. Endozytose, inhibiert die Transkription von Claudin-5 (s.o.) (74). Unter chronischem Einfluss von VEGF und damit langfristiger Verminderung funktioneller Zell-Zell-Kontakte durch VE-Cadherin kommt es zu schweren Schädigungen der TJs durch Verminderung der Claudin-5 Expression (74).

Oxidativer Stress durch Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) scheint einen ähnlichen Effekt zu haben. Durch Interaktion mit β -Catenin oder VE-Cadherin kommt es zu Permeabilitätssteigerung sowie langfristig zu verminderter Claudin-5-Expression und damit geschwächter TJs (74).

1.2 Altersabhängige Makuladegeneration

1.2.1 Definition, Epidemiologie und klinische Einteilung

Die AMD ist eine chronisch degenerative, meist bilaterale Erkrankung der zentralen Retina, genauer gesagt der Makula – des Punktes des schärfsten Sehens. Betroffen sind vor allem äußere Schichten der Retina, insbesondere das retinale Pigmentepithel. Die Diagnose und Einteilung in Schweregrade werden klinisch anhand festgelegter Kriterien gestellt. Bei Vorliegen einer oder mehrerer der in Tabelle 1 dargestellten Augenhintergrundveränderungen kann die Diagnose einer AMD gestellt werden (15):

Frühe Stadien	Fortgeschrittene Stadien		
<i>altersabhängige Makulopathie – trockene AMD</i>	<i>Geographische Atrophie – trockene AMD</i>	<i>Neovaskuläre Form – feuchte AMD</i>	
Weiche Drusen der Bruchschichten Membran	Progredienter Zelluntergang des RPE, der Choriokapillaris und der neurosensorischen Netzhaut ohne CNV, Ödeme, PEA	Choroidale Neovaskularisationen mit Blutungen, Leckage und subretinalem Ödem	Okkult Klassisch Retinale Angiomatöse Proliferation (RAP)
Hyper- und Depigmentierungen		Pigmentepithelabhebung Risse im RPE Endstadium: Disziforme Narbe	

Tabelle 1 Stadien der Altersbedingten Makuladegeneration (vgl. (15))

90% der Patienten sind von einer trockenen Makuladegeneration betroffen, nur 10% entwickeln die feuchte Form der Erkrankung. Auch wenn die feuchte Makuladegeneration mit ihrer häufigsten Ausprägung als choroidale Neovaskularisation weniger verbreitet ist, ist sie doch verantwortlich für die meisten Erblindungen unter AMD-Patienten (182).

Risikofaktoren dieser multifaktoriellen Erkrankungen sind u.a. Rauchen, kaukasische Abstammung, weibliches Geschlecht, hohes Alter, genetische Prädisposition, Lichtexposition, erhöhter BMI, Kataraktchirurgie, blaue Irisfarbe sowie Hypertonieerkrankungen (96).

Von den verschiedenen nationalen und internationalen Klassifikationssystemen ist wohl die Einteilung nach der Age-Related Eye Disease Study (AREDS)-Klassifikation am gebräuchlichsten. Es unterscheidet einerseits zwischen keinen, normalen und AMD-typischen Altersveränderungen. Die AMD-Stadien werden in Frühe (nur Drusen), Intermediäre (Drusen und AMD- Pigmentveränderungen) sowie Späte AMD mit CNV oder Geographischer Atrophie unterteilt (65).

1.2.2 Diagnostik

Wichtiges diagnostisches Kriterium aller AMD-Stadien ist die Selbstkontrolle mithilfe des Amsler-Netzes. Die Patienten können damit Metamorphopsien schnell selbstständig erkennen. Diese Metamorphopsien können Hinweise auf ein pathologisches Korrelat der Retina, wie z.B. eine CNV oder RPE-Veränderungen sein (173).

Neben der Visusbestimmung als Verlaufsparemeter gibt es objektive Untersuchungsmethoden, die eine Aussage über die Ausprägung der Erkrankung erlauben.

Zunächst bietet die Funduskopie oder Spaltlampenbiomikroskopie der Netzhaut einen ersten Eindruck auf die Verhältnisse in der zentralen Retina.

Detaillierte Informationen über intraretinale Vorgänge liefert die optische Kohärenztomographie. In einem nicht-invasiven Verfahren wird ein Schnittbild durch die Schichten der Retina generiert. Hier können intraretinale Veränderungen wie Ödeme oder Zysten, subretinale Flüssigkeitsansammlungen, subretinale und choroidale Neovaskularisationen, Amotiones sowie epiretinale Membranen detektiert werden (80). Die genaue Funktionsweise der OCT wird in 2.2. erläutert.

Die Beurteilung von Gefäßpathologien erfolgt durch die Fluoreszenzangiographie. Fluoreszein (FZ) oder Indocyangrün (ICG) werden verdünnt intravenös gegeben und durch den Kreislauf in die retinalen und choroidalen Gefäße verteilt. Durch blaues bzw. Infrarotlicht werden diese fluoreszierenden Farbstoffe angeregt und sichtbar gemacht. Anhand des Zeitpunktes der Anflutung kann das markierte Gefäß identifiziert werden. Mithilfe der FAG können u.a. Gefäßverschlüsse der Netzhaut, Mikroaneurysmen und auch die für die AMD typischen Leckagen, CNV und RPE-Veränderungen dargestellt werden (S.43-44 (80)).

1.2.3 Therapie der Frühstadien und der trockenen AMD

Eine wirksame Prophylaxe ist für die AMD nicht bekannt. Die Deutsche Gesellschaft für Ophthalmologie empfiehlt zur Primär- und Tertiärprophylaxe eine Reduktion der Risikofaktoren, insbesondere des Rauchens sowie eine ausgewogene Ernährung.

Patienten mit einer mindestens einseitigen intermediären oder fortgeschrittenen AMD wird neben klinischer Verlaufsbeobachtung die Einnahme der in Tabelle 2 aufgeführten Nahrungsergänzungsmittel zur Verlangsamung der Krankheitsprogression empfohlen:

Supplement	Dosierung
Vitamin C	500 mg
Vitamin E	400 IE
Zink	25 mg
Kupfer	2 mg
Lutein/Zeaxanthin	10 mg/2mg
ODER β-Karotin	15 mg

Tabelle 2 Empfohlene Nahrungsergänzungsmittel zur Verlangsamung der Progression einer intermediären oder fortgeschrittenen AMD nach Empfehlung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft Stand 2014 (46)

Für Patienten mit beidseitiger fortgeschrittener AMD im Spätstadium liegen noch keine ausreichenden Daten für eine Empfehlung vor (46).

1.2.4 Exsudative „feuchte“ AMD

Der Begriff *Exsudative AMD* beschreibt eine Gruppe Pathologien der Spätform der AMD und umfasst Neovaskularisationen jedweder Herkunft, die Pigmentepithelabhebung und retinale Ödeme.

Neovaskularisationen in der Retina können aus retinalen Kapillaren (Retinale Angiomatöse Proliferation – RAP) oder aus der Choriokapillaris (CNV – siehe 1.2.5) entstehen.

Die RAP führt zur Proliferation retinaler Kapillaren, Ausbildung von Teleangiektasien und im Verlauf einer retino-choroidalen Anastomose. Im Anfangsstadium ist nur eine intraretinale Proliferation vorhanden, die sich im Verlauf zu subretinalen Neovaskularisationen mit seröser PEA, Blutungen und intraretinalen Ödemen entwickelt. Das Endstadium ist die CNV mit retino-choroidaler Anastomose.

10-15 % der Neovaskularisationen bei AMD fallen in die Kategorie der RAP (57).

Eher selten mit 8 % ist die Polypoidale choroidale Vaskulopathie (PCV). Bei der PCV treten Ektasien der peripapillären oder makulären, choroidalen Gefäße auf, welche durch subfoveale Exsudationen und Blutungen zu Visusverschlechterungen führen. Allerdings ist der Verlauf zumeist mild mit spontanen Regressionen. Teilweise tritt auch eine RPE-Atrophie auf (57).

Die Pigmentepithelabhebung (PEA) kann seröser oder fibrovaskulärer Natur mit unterliegender okkultter CNV sein. Es kommt zur Ablösung und Vorwölbung des RPE von der darunterliegenden Bruchschichten Membran. In dem entstehenden Zwischenraum befinden sich je nach Ursache seröse Flüssigkeit, Blut oder Neovaskularisationsmembranen (31).

Beide Formen der PEA - serös oder fibrovaskulär- können Komplikationen einer CNV sein. Durch Ruptur von CNV entstehen hämorrhagische PEAs.

Klinisch resultiert die Vorwölbung zunächst nur in einer Hyperopie, im Verlauf kann sich der Visus allerdings durch Fibrose, Atrophie oder im schlimmsten Fall durch einen Riss im RPE verschlechtern (57).

Gemeinsames Endstadium der exsudativen AMD ist die disziforme Narbe (Junius Kuhnt Makulopathie). Exsudationen, Blutungen, RPE-Hyperplasie, immunologische Entzündungsprozesse und CNV lösen in umliegenden Geweben atrophische Reaktionen und Narbenbildung aus. Je nach Ursache kann auch die disziforme Narbe trocken-fibrotisch oder exsudativ mit Amotio in den Randbereichen ausgeprägt sein (57).

1.2.5 Choroidale Neovaskularisation

1.2.5.1 Einteilung der choroidalen Neovaskularisation

Choroidale Neovaskularisationen werden aufgrund ihrer Ausbreitung in Bezug auf das RPE eingeteilt. Endothelzellen aus der Choriokapillaris dringen in retinale Bereiche bis zum RPE oder darüber hinaus in die Neuroretina vor (57).

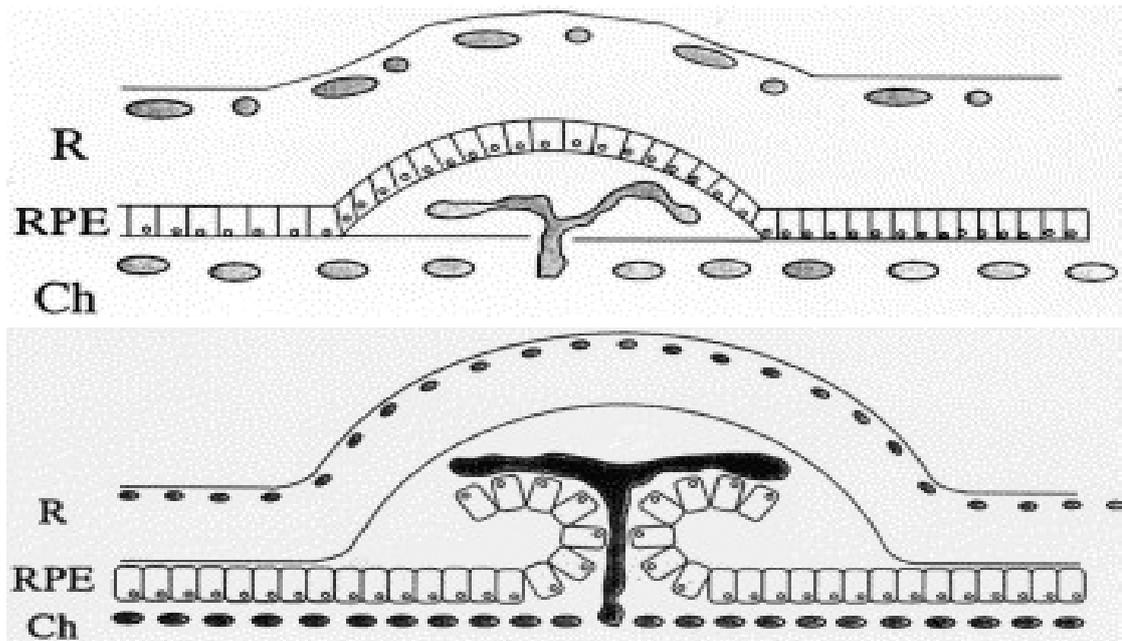


Abbildung 5 CNV Typ I (oben) und CNV Typ II (unten) (82)

Die okkulte, oder Typ I CNV breitet sich unterhalb des RPE aus und reicht primär nicht bis in die Neuroretina hinein. 80% aller neu diagnostizierten CNV-Membranen sind okkulte CNVs (Typ I). Durch die Lage unterhalb des Epithels ist eine häufige Komplikation die Pigmentepithelabhebung (PEA) bis hin zum RPE-Riss (57, 82).

Die klassische, oder Typ II CNV durchbricht das RPE und proliferiert zwischen RPE und Neuroretina (siehe Abbildung 5). Sie macht nur 10-15% aller neu diagnostizierten CNVs aus. Die damit seltenste Form der CNV hat eine schlechte Prognose, da sie schneller wächst und zu einer rascheren Visusverschlechterung führt als die okkulte CNV (Typ I) (57).

Oft ist die Unterteilung zwischen den beiden Typen nicht möglich, da es sich um Übergangsformen handelt. Die gemischt klassisch-okkulte CNV wird nochmal nach ihrem größten Anteil in überwiegend oder minimal klassische (Typ II) CNV eingeteilt. Diese Unterscheidung ist vor allem hinsichtlich Therapie und Prognose wichtig (57).

Zur Unterscheidung und Verlaufsbeurteilungen eignen sich optimalerweise die FAG und das OCT, wobei auch hier eine klinische Unterscheidung zwischen den CNV-Typen oft nur schwer möglich ist. In der Fluoreszenzangiographie lässt sich die okkulte CNV (Typ I) durch langsame und irreguläre Hyperfluoreszenz sowie späte und im Vergleich schwächer sichtbare Leckage erkennen, während die klassische CNV (Typ II) schon in der arteriellen Phase scharf abgrenzbar hyperfluoreszent ist und in der Spätphase eine deutliche Leckage bildet.

Im OCT zeigen beide spindelförmige Verdickungen über oder auf Höhe der hyperreflektiven

Schicht aus RPE/Bruchscher Membran/Choriokapillaris. Gelegentlich kann auch die Membran der klassischen CNV abgegrenzt werden (57).

1.2.5.2 Pathogenese der choroidalen Neovaskularisation bei AMD

Choroidale Neovaskularisationen sind definiert als pathologisches Einwachsen choroidaler Gefäße in die Retina (57). Die Proliferation und Migration choroidaler Endothelzellen aus der Choriokapillaris kann zu CNV an jeder Schicht auf dem Weg von Choriokapillaris zur Neuroretina führen (120).

Die Ursachen dieser Proliferation und Migration sind multifaktoriell und nur unvollständig entschlüsselt. Die CNV besteht aus einem vaskulären und einem extravaskulären Anteil. Die vaskulären Komponenten beinhalten Endothelzellen, die umgebenden Perizyten sowie Vorläuferzellen (endothelial progenitor cells – EPCs) der Endothelzellen. Extravaskuläre Anteile sind Teil des inflammatorischen Systems - Makrophagen, Granulozyten, Lymphozyten - und des Bindegewebes - Fibrozyten, Myofibroblasten (160).

Die Pathogenese der CNV beinhaltet demnach zwei große, miteinander interagierende Komponenten - die Angiogenese und die Inflammation (160).

Ein Faktor, welcher vor allem die Angiogenese betrifft, ist wohl die Sekretion von proliferativen Substanzen für das Endothel durch das Retinale Pigmentepithel. Diese wird unter anderem durch eine Hypoxie des Endothels ausgelöst (120).

Die Hypoxie kann zum einen aus vaskulären Schäden der Choriokapillaris resultieren. Eine Reduzierung der Blutversorgung der Makula, sowie Kapillarverlust, Wandunregelmäßigkeiten und Lumenreduzierung der Choriokapillaris in Patienten mit AMD und CNV konnten bereits nachgewiesen werden (98, 121). Es wird über eine gemeinsame Pathophysiologie zwischen kardiovaskulären Erkrankungen wie Koronare Herzerkrankung und Cerebralinhalten diskutiert, da ein epidemiologischer Zusammenhang zwischen den Erkrankungen hergestellt werden konnte. Auch die gemeinsamen Risikofaktoren wie Rauchen, Alter, erhöhter Body Mass Index sowie Hypertension sprechen für gemeinsame vaskuläre Veränderungen (51, 179). Eine Schädigung der Choriokapillaris fördert durch Hypoxie die VEGF-Ausschüttung und geht wahrscheinlich der CNV voraus (121).

Mit steigendem Alter und auch durch die Einlagerung von Lipiden (weiche Drusen) kommt es zu einem höheren Diffusionswiderstand und damit zur Verschlechterung des metabolischen Austausches zwischen RPE und Choroid. Dies könnte sowohl eine Hypoxie begünstigen als auch den Transport von angiogenen Faktoren beeinflussen (124).

Jede Hypoxie der RPE Zellen resultiert in einer erhöhten Freisetzung von VEGF (102).

Oxidativer Stress spielt ebenfalls eine Rolle in der Entstehung der AMD sowie der CNV. Besonders die Makula ist langjährigem oxidativem Stress durch die bevorzugte Sauerstoffversorgung und Lichtexposition ausgesetzt. Durch die Lichtexposition entstehen in den Photorezeptoren (FR) photo-oxidative Radikale. Diese zytotoxischen Substanzen werden mit den Spitzen der äußeren FR-Segmente im Rahmen des Erneuerungsprozesses abgestoßen. Durch Phagozytose werden diese von den RPE-Zellen aufgenommen. Damit sind auch die RPE-Zellen großem oxidativen Stress ausgesetzt, der früher oder später zu RPE-Atrophie führt. Aufgrund ihrer lichtexponierten Position ist die Makula hiervon ebenfalls besonders betroffen (163). Neben exogenen Ursachen oxidativen Stresses werden freie Radikale auch endogen produziert. Endogener Ursprung freier Radikaler sind die Mitochondrien im Rahmen der Atmungskette sowie Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidasen (66). Physiologischerweise werden freie Sauerstoffradikale, die durch Oxidation von Molekülen Schaden anrichten, von Enzymen, z.B. Glutathion reduziert. Verschiedene antioxidative Systeme sind auf die reduktiven Eigenschaften von NADPH angewiesen (85). Dieses wird durch Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase regeneriert, also seinerseits reduziert (100). Auch Vitamine, wie Vitamin C und E, reduzieren den oxidativen Stress und die Freisetzung radikaler Sauerstoffspezies und NO-Synthese in der Retina (61).

Eine vermehrte Aktivität der NADPH-Oxidase oder eine Hemmung antioxidativer Systeme und damit mehr Oxidativer Stress initiiert die Bildung von Neovaskularisationen (94). Die Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führt zudem in RPE-Zellen zu einer vermehrten Expression und Abgabe der für Endothelzellen proproliferativen und permeabilitätsfördernden Substanz VEGF (102).

Oxidativer Stress führt somit in der Retina sowohl zu einer vermehrten VEGF-Produktion sowie zu einer Schädigung der äußeren Blut-Retina-Schranke und CNV Barriere (RPE-Atrophie).

Die Angiogenese und damit primäre Ausbildung der CNV hängt demnach maßgeblich von der VEGF Expression und Verteilung ab. VEGF ist Initiator der CNV-Bildung und wirkt durch die Bindung an VEGFR-2 (VEGF-Rezeptor 2) proangiogen, permeabilitätsfördernd und lenkt die Migration der Endothelzellen (62).

VEGF ist ein wichtiger physiologischer Überlebensfaktor für Endothelzellen, da er beispielsweise ihre Apoptose hemmt. Andererseits kann eine übermäßige Expression Neovaskularisationen induzieren. Hohe Konzentrationen VEGF wurden in CNV-Membranen aller Arten nachgewiesen. Es stimuliert die Proliferation und Migration entlang des VEGF-Gradienten von Endothelzellen jedweder Gefäße, verstärkt die Permeabilität der Gefäße und fördert die Chemotaxis von Monozyten (62).

Aufgrund der oben genannten Mechanismen, im Rahmen von oxidativem Stress, Hypoxie oder inflammatorischer Stimuli kann VEGF aus Endothelzellen, RPE-Zellen, MZ, Photorezeptoren, Perizyten und Ganglienzellen freigesetzt werden, wobei die RPE-Zellen einen Großteil ausmachen (62). Unter physiologischen Bedingungen sezernieren die MZ den antiangiogenen PEDF. Diese Sekretion wird durch VEGF inhibiert. Durch noch nicht vollständig entschlüsselte Trigger sezernieren die MZ unter vielen pathologischen Bedingungen VEGF (52).

Zur Entstehung der CNV kommt es also auch durch eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen pro- und antiangiogenen Substanzen auf die Seite der proangiogenen Mediatoren.

VEGF bewirkt wie bereits erwähnt die Phosphorylierung von Proteinen der Tight und Adherens Junctions, lockert die Zellkontakte und erhöht damit die Permeabilität der Zellverbände der Endothel- und RPE-Zellen. Ein solcher Effekt wurde bereits bei Occludin, ZO-1, Cadherin sowie Catenin nachgewiesen (6, 39, 56). Es beeinflusst also sowohl die Angiogenese als auch die BRS.

Das fenestrierte choroidale Endothel ist stark abhängig von VEGF-A, welches von den RPE-Zellen abgegeben wird. Damit es zu einer pathologischen Neovaskularisation in die Retina kommt ist jedoch wahrscheinlich ein Defekt in der Bruchschens Membran notwendig (29). Es konnte zum einen nachgewiesen werden, dass die Bruchsche Membran im Bereich der Makula dünner und poröser ist als im restlichen Bereich der Retina. Zum anderen ist die Lamina elastica bei Patienten mit AMD in jedem Stadium der Erkrankung poröser als bei gesunden Patienten. Dies könnte eine Erklärung für die Ausprägung der Makula als Prädilektionsstelle der AMD und für die allgemeine Anfälligkeit der Makula für degenerative Veränderungen sein (36).

Inflammatorische Prozesse in der CNV beinhalten Makrophagen, Lymphozyten und inflammatorische Mediatoren wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (160). Ob Makrophagen, welche Kollagenasen und Elastasen sezernieren, können an der Durchbrechung der Bruchschens Membran beteiligt sind oder sie erst nach Entstehung des Defektes dorthin migrieren ist noch nicht bekannt (83). Makrophagen beeinflussen die Größe und Ausprägung der CNV (55) und sezernieren im Rahmen der CNV ihrerseits VEGF (91). Über die Sekretion von TNF- α wird zudem die VEGF-Produktion der RPE-Zellen verstärkt, sowie durch das Monocyte Colonization Protein weitere Makrophagen angelockt (84).

Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP) sind Enzyme, die Proteine der Extrazellulärmatrix (EZM) spalten und in der Retina vom Endothelium sowie von Makrophagen sezerniert werden. In der CNV bahnen sie den Weg für die einwachsenden Gefäße. Besonders MMP-9 wurde am Rande

der Neovaskularisationen und unter der Bruchschichten Membran nachgewiesen. Antagonistisch wirken Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) aus dem RPE (161).

Nach dem Initiationsstadium mit CNV-Entwicklung geht die CNV-Membran in ein aktives Stadium mit CNV-Wachstum über (84). Im Verlauf stabilisiert sich die Ausbreitung der CNV-Membran, wenn wieder ein Gleichgewicht zwischen den pro- und antiangiogenen Komponenten wie MMPs und TIMPs, PEDF, Platelet-derived growth factor (PDGF) und VEGF erreicht wird (83, 161).

Überwiegen die antiangiogenen, antiproteolytischen und antimigratorischen Mediatoren, fibrosiert die CNV-Membran und es bildet sich eine disziforme Narbe. Dies resultiert meist aus einer starken Ischämie, therapeutischen Maßnahmen, wie Anti-VEGF-Therapie, oder Restauration der Blut-Retina-Schranke (83).

Für viele dieser pathophysiologischen Vorgänge können auch genetische Veränderungen ursächlich sein. Tatsächlich konnten Gene gefunden werden, die einen Teil dieser Pathogenese beeinflussen. Der Großteil ist jedoch noch unerforscht und auch genetische Diagnostik oder Therapieansätze haben noch keinen Stellenwert in der klinischen Behandlung der CNV im Rahmen der AMD (101).

1.2.6 Mausmodell der CNV bei AMD

Die komplexe Pathogenese der CNV macht die Erforschung an lebenden Organismen notwendig. Auch wenn Mäuse nicht über eine Makula verfügen, haben sich degenerative und pathologische Prozesse der Mausretina als vergleichbar zu Vorgängen humaner Retinae erwiesen. Aufgrund der geringeren Lebenszeitspanne sind altersbedingte Pathomechanismen schon nach kurzer Zeit detektierbar (144).

Ein aussagekräftiges und international angewendetes Modell zur Untersuchung der CNV bei AMD ist das Maus-Modell der laserinduzierten CNV. Dabei wird durch Argon-Laser-Strahlen die Bruchschichten Membran zerstört und damit das Einwachsen choroidaler Gefäße ermöglicht (29). Im Gegensatz zu bestehenden transgenen Mausmodellen können laserinduzierte Neovaskularisationen auch in schwarzen Wildtyp-Mäusen erzeugt werden und sind daher nicht auf spezielle Züchtungen angewiesen. Weitere Vorteile sind Effizienz und die gute Reproduzierbarkeit, wenn der Laser immer von derselben Person bedient wird (21).

1.2.7 Therapieansätze der exsudativen Makuladegeneration

1.2.7.1 VEGF-Inhibitoren

VEGF, insbesondere VEGF-A, kommt im Rahmen der Ausbildung der CNV eine führende Rolle zu. Daher ist es auch der Angriffspunkt der meisten verfügbaren Therapien (12, 62). Viele verschiedene VEGF-Antagonisten die zu einer Visusverbesserung führen sind mittlerweile auf dem Markt: Pegaptanib sodium (Macugen), Ranibizumab (Lucentis), Bevacizumab (Avastin), Aflibercept (Eylea) etc. (12). Sie binden an VEGF und reduzieren dadurch die biologische Verfügbarkeit (181). Diese Substanzen, welche als intravitreale Injektionen verabreicht werden, finden mit untereinander vergleichbarem Erfolg klinische Anwendung (11).

Auch wenn die VEGF- Antagonisten erhebliche Erfolge erzielt haben, gibt es einen großen Teil der Patienten, die nur schlecht oder gar nicht auf die Therapie ansprechen. Non-Responder sind je nach Studie 19,9-37% der Patienten. Viele Patienten sprechen auch nur für einen kurzen Zeitraum auf die Therapie an (181). Insgesamt bleibt häufig eine refraktäre neovaskuläre AMD zurück. Diese ist definiert als eine klinisch oder im In-Vivo-Imaging persistierende Exsudation (Leckage, PEA mit intraretinaler Flüssigkeit, subretinale Flüssigkeit) oder sogar zunehmende Hämorrhagie nach 6 Monaten mit monatlichen intravitrealen Injektionen (181).

Ein weiteres Problem sind Rezidive. Eine wiederkehrende AMD kann definiert werden als Auftreten neuer Flüssigkeitsansammlungen nach Abschluss der Anti-VEGF-Behandlung (181). Bei diesen Rezidiven entwickelt sich zum Teil eine verminderte oder aufgehobene Wirksamkeit der Anti-VEGF-Behandlung und damit eine refraktäre neovaskuläre AMD (181).

Eine langfristige Anwendung der anti-VEGF-Therapie ist oftmals notwendig. Die Langzeitauswirkungen der Anti-VEGF-Therapie sind umstritten und Gegenstand weiterer Forschung (72). VEGF ist ein Überlebensfaktor für viele retinale Zellen, sowohl der Neuroretina, des RPE und der Choriokapillaris (67, 72, 130) Bei langfristiger Anti-VEGF-Therapie kommt es zum Teil zu makulärer Atrophie (Geographische Atrophie oder RPE-Atrophie), die auch mit dem Wegfall dieser protektiven Wirkung im Zusammenhang steht (127). Auch wenn die geographische Atrophie ein Teil der Ursprungserkrankung ist und gegebenenfalls auch schon mit der CNV aufgetreten sein kann, ist ein schnelleres Fortschreiten der Erkrankung mit ggf. auch neu entstehender makulärer Atrophie im Zusammenhang mit der Therapie ersichtlich (72). Auch mögliche Nebenwirkungen durch die

intravitreale Injektion wie Endophthalmitis, okkulare Druckerhöhung, Blutung, sowie leichte systemische vaskuläre Effekte der anti-VEGF-Therapie können auftreten (77).

Somit ist die VEGF-Therapie zwar eine wirksame Therapieoption, aber aufgrund der o.g. Grenzen ihrer Wirksamkeit und der möglichen Komplikationen werden Alternativen oder mögliche Kombinationstherapien benötigt.

1.2.7.2 Placental-Growth-Faktor

Placental-Growth-Faktor (PlGF) ist Teil der VEGF-Familie, spielt allerdings in der physiologischen Funktion der Retina eine untergeordnete Rolle (47). In CNV-Membranen bei exsudativer AMD konnten jedoch erhöhte PlGF-Expressionen nachgewiesen werden. Ein Fehlen von PlGF reduzierte die Größe der CNV. PlGF spielt also eine Rolle in der Pathogenese der CNV und ist ein Angriffspunkt für neue Therapien (143).

PlGF ist bereits als Therapieziel in die VEGF-Therapie integriert worden. Mit Aflibercept ist ein Anti-VEGF-Therapeutikum auf dem Markt, welches ebenfalls die Wirkung von PlGF inhibiert (153).

1.2.7.3 Experimentelle Therapieansätze

Neue Therapieoptionen werden derzeit erforscht. Gentherapie mit rAAV.sFlt-1 könnte vielversprechende Ergebnisse bieten und auch viele andere der bereits beschriebenen Pathomechanismen werden als neue Angriffspunkte für alternative Therapiekonzepte untersucht (37). Eine Möglichkeit bietet der Eingriff in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Die Inhibition des RAAS konnte bereits in der Kardiologie, aber auch in ophthalmologischen Erkrankungen wie diabetischer Retinopathie und Chorioretinopathie den Progress und insbesondere die Neovaskularisation beeinflussen (23). Einen ähnlichen Einfluss vermuten Wissenschaftler für die exsudative Form der AMD, daher ist dies auch Thema dieser Arbeit.

1.3 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

1.3.1 Definition

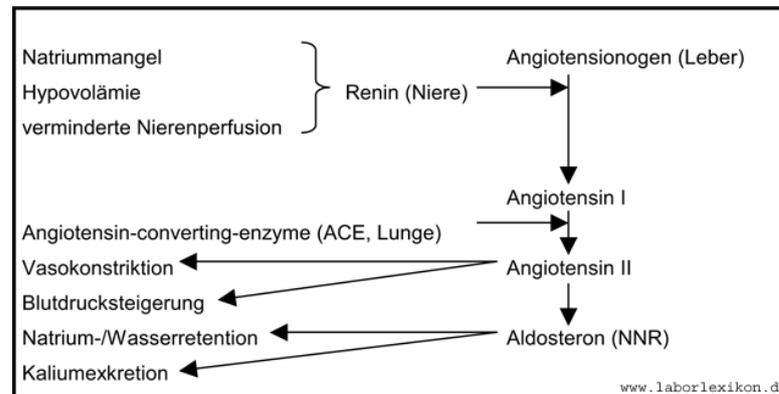


Abbildung 6 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (74)

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ist eher durch seine Wirkung auf die Niere und das Herz-Kreislauf-System, insbesondere den Blutdruck und den Wasserhaushalt, bekannt (siehe Abbildung 6). Juxtaglomeruläre Zellen der Niere sezernieren Renin, welches das von der Leber und anderen Geweben sezernierte, systemisch verfügbare Angiotensinogen zu Angiotensin I (ANG I) spaltet (9). Angiotensin I hat eine untergeordnete klinische Bedeutung und wird vom Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) gespalten. Dabei entsteht das biologische aktive Angiotensin II (ANG II) (159). Das meiste ACE ist membrangebunden an Zellmembranen von Endothelzellen, neuroepithelialen Zellen u.a., ein kleinerer Teil zirkuliert als lösliches ACE (54). Dadurch beeinflusst ACE direkt die Konzentration des Vasokonstriktors ANGII im Blut und damit den Blutdruck (54). Die Wirkung von ANG II wird hauptsächlich durch Bindung an den Angiotensin II Rezeptor 1 (ATR 1) vermittelt. Dieser Rezeptor wird von vielen Geweben exprimiert (73). Über den ATR 1 wirkt ANG II vasokonstriktiv und damit blutdrucksteigernd, regt die Wasserretention und renale Salzurückresorption an und aktiviert die Sekretion von Aldosteron (73).

Bisherige Strategien der Beeinflussung des Systems beinhalten die Inhibierung des ACE (ACE-Hemmer), Antagonisierung der ANG II Wirkung am ATR 1 (ATR-1 Rezeptorantagonisten) und der Aldosteronwirkung am MR (Spironolacton/Eplerenon) (157).

Auch wenn die Aldosteronsekretion durch ANG II vermittelt wird, führt eine Antagonisierung von Angiotensin durch ACE-Hemmer nicht zu einer vollständigen Suppression von Aldosteron. Dieser Umstand wird Aldosteron-Escape-Phänomen genannt. Die Aldosteronsekretion wird auch vom Adrenocorticotropen Hormon (ACTH), Hyperkaliämie und Kortikosteroiden stimuliert. Bei 30-40% der mit ACE-Hemmern behandelten Patienten

mit Herzinsuffizienz kommt es trotz Therapie zu einem Aldosteronanstieg. Eine suffiziente Blockade der RAAS-Wirkung an jedwedem Gewebe muss also auch eine Antagonisierung von Aldosteron beinhalten (157).

1.3.2 Aldosteron und Spironolacton

Das Steroidhormon Aldosteron wird in der Zona reticulosa der Nebennierenrinde, sowie verschiedenen peripheren Organen lokal synthetisiert. Aldosteron wirkt überall im Körper durch Bindung an den Mineralokortikoidrezeptor. In der Niere initiiert Aldosteron eine vermehrte Natriumretention und Kaliumausscheidung durch Regulation der renalen Natrium- und Kaliumkanäle. Als Konsequenz entstehen Ödeme und eine Hypokaliämie (157). Die erhöhte Natriumkonzentration im Blut führt in den Gefäßen zu einer vermehrten Vasokonstriktionsbereitschaft und damit zu Perfusionsdefiziten. ANG II und Aldosteron wirken synergistisch vasokonstriktorisch (157).

Aldosteron führt auch in Geweben, z.B. im Herzen, zu vermehrtem oxidativem Stress. Ein aktivierter MR führt am Herzen und an Gefäßen allgemein zu einer vermehrten Expression der NADPH-Oxidase, einem Enzym, welches zu vermehrter Radikalbildung führt (157). Generell senkt Aldosteron die Expression der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) in vitro (in Endothelzellen sowie Perizyten), aber auch in vivo. Geringere Mengen an G6PDH führen zu vermehrtem oxidativem Stress sowie vermindertem Stickstoffmonoxid (NO) (107). NO kontrolliert den vaskulären Tonus. Eine Verminderung der NO-Konzentration begünstigt kardiovaskuläre Erkrankungen (68). Durch Aldosteron vermittelter oxidativer Stress führt im Herzen zu Fibrosierung, Remodeling und vaskulärer Inflammation (157).

Aldosteron moduliert Tight und Adherens Junctions an Endothelzellen. Mithilfe von menschlichen Umbilikalvenenendothelzellen (HUVECs) konnte gezeigt werden, dass Aldosteron kurzfristig durch Restrukturierung und Modifizierung von VE-Cadherin, ZO-1 und Claudin 5 in Zell-Zell-Kontakten die Permeabilität der Gewebe erhöht. Dies kann zu vermehrter Leckage führen und die Ausbildung von Neovaskularisationen begünstigen (97). Diese Umstrukturierungen auf Proteinebene könnten auch eine Erklärung für die verminderte Ausbildung von Neovaskularisationen bei Retinopathie durch Inhibition von Aldosteron darstellen (45).

Der Steroidabkömmling Spironolacton ist ein bereits langjährig klinisch erprobtes kaliumsparendes Diuretikum. Spironolacton blockiert den Mineralokortikoidrezeptor (MR) (116). Initial wurde es zur Behandlung von Aszites und Hypertension eingesetzt (20), heute ist es zusätzlich Bestandteil der Herzinsuffizienztherapie (116). In Patientengruppen mit

kardialen Erkrankungen konnte die Mortalität durch Spironolactongabe gesenkt werden (140). Spironolacton reduziert endotheliale Dysfunktion und inhibiert auch die Umwandlung von ANG I in ANG II in Patienten mit Herzinsuffizienz (60). Spironolacton ist ein sehr sicheres Medikament mit moderatem Nebenwirkungsprofil (140). Zu den seltenen unerwünschten Wirkungen zählen Hyperkaliämie und Hyponatriämie. Durch geringe Rezeptorselektivität kann Spironolacton Gynäkomastie bei Männern und Amenorrhoe bei Frauen verursachen. Als Alternative gilt in diesen Fällen das weniger potente, allerdings selektivere Eplerenon (116).

Die aus Spironolacton hervorgehenden Metabolite (Canrenon und eine Methylthio-Verbindung) kumulieren und entwickeln ihre volle Wirksamkeit erst nach einigen Tagen. Auch die Hemmung der Proteinbiosynthese wird erst effektiv, wenn die noch vorhandenen Metabolite verbraucht sind, sodass der klinische Effekt des Medikaments verzögert auftritt (116).

1.3.3 Intraretinales RAAS

Nahezu alle Bestandteile des Renin-Angiotensin- Aldosteron-Systems konnten bereits im Auge sowie in besonders starken Konzentrationen in Uvea und Retina nachgewiesen werden. Im Choroid und der Retina des Menschen sind Prorenin, Renin, ACE, Angiotensinogen und der Angiotensin-Rezeptoren vorhanden (175).

Insbesondere in der Retina scheint auch Aldosteron eine große Rolle zu spielen und sogar lokal synthetisiert zu werden. Das Enzym Aldosteron-Synthase wurde sowohl in der Mikrovaskulatur, retinalen Endothelzellen, MZ, Ganglion-Zellen, Mikroglia und RPE-Zellen von verschiedenen Tier-Spezies nachgewiesen (45, 177).

Vermittelt wird die Aldosteronwirkung an der Retina, retinalen Endothelzellen, Ganglienzellen und dem RPE durch den dort exprimierten Mineralocorticoid-Rezeptor (MR) (177). In retinalen Endothelzellen wird der MR nach Aldosteronaktivierung in den Nucleus überführt, um Signalwege in Gang zu setzen (177).

Für viele retinale Erkrankungen mit retinalen oder choroidalen Neovaskularisationen konnte ein Einfluss des RAAS, insbesondere durch Angiotensin II oder Aldosteron nachgewiesen werden (177).

Die Inhibition der Aldosteron-Synthase in Ratten reduzierte Neovaskularisationen im Rahmen der Sauerstoffinduzierten Retinopathie (45).

Aldosteron stimuliert die Angiogenese über den MR retinaler Endothelzellen. Es konnte nachgewiesen werden, dass Aldosteron in vitro die Proliferation von Rinder-Retinaendothelzellen verstärkt und die Tubulogenese fördert. Dieser Effekt konnte durch

Antagonisierung mit Spironolacton verhindert werden (177). Höhere Konzentrationen von Aldosteron führen zur Elevation der ANGII und VEGF-Level. Dieser Effekt kann sowohl durch Spironolacton als auch durch ACE-Hemmer komplett aufgehoben werden (123). Aldosteron beeinflusst die VEGF-Expression also auch über ANG II.

Auch die inflammatorische Pathogenese retinaler Neovaskularisationen konnte durch Modulation des lokalen RAAS-Systems beeinflusst werden. Aldosteronantagonismus mit Spironolacton reduzierte die Leukostase in Mäusen mit Sauerstoffinduzierter Retinopathie (177). Antagonismus am ATR1 Rezeptor, also die Inhibierung von Angiotensin II, führte zu einer verminderten Sekretion von Monocyte-chemoattractant-protein (MCP)-1, dem Makrophagen anlockenden Mediator (177).

Aldosteron beeinflusst in der Retina durch die bereits in 1.3.2 erläuterten Prinzipien den oxidativen Stress. In Rinder-Retina-Endothelzellen sowie retinalen Perizyten wird durch Aldosteronwirkung in Kombination mit Salz die Expression der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH, siehe 1.2.5.2) verringert (177). Zusätzlich findet sich unter Aldosteroneinwirkung ein vermehrtes Vorkommen von Untereinheiten der NADPH-Oxidase, einem Enzym, welches freie Radikale produziert. Diese fördern wie bereits beschrieben durch Verstärkung der Inflammation und Angiogenese die CNV (176, 177).

Die Funktion der Blut-Retina-Schranke wird durch Aldosteron ebenfalls modifiziert. Der aktivierte MR verändert den retinalen Wasser- und Elektrolythaushalt. Natriumkanäle vom Typ ENaC, Kaliumkanäle (Kir 4.1) sowie Aquaporin 4 als Wasserpore wurden unter Aldosteroneinfluss vermehrt exprimiert. Vermehrter Wassereinstrom kann retinale Ödeme und damit eine größere zentrale Retinadicke zur Folge haben (187).

Aufgrund dieser Erkenntnisse werden derzeit bereits einzelne Versuche gemacht, retinale Erkrankungen mit subretinaler Flüssigkeit oder Neovaskularisationen mithilfe von MR-Antagonisten zu behandeln.

Für die Therapie der chronischen Retinitis centralis serosa wird die Wirkung des Aldosteronantagonismus derzeit erforscht. In einer randomisierten kontrollierten Studie konnte bei den Patienten eine Reduzierung von subretinaler Flüssigkeit und Retinadicke nachgewiesen werden. Ein Akteur der Pathogenese der wohl vom aktivierten MR kontrolliert wird ist der Kaliumkanal (KCa) 2.3 im Choroid (23). Die positiven Effekte der MR-Antagonisten Behandlung konnten auch in einer Langzeitnachbeobachtung über 24 Monate weiterhin nachgewiesen werden (188).

Allerdings ist auch von einem Fall berichtet worden in dem die Zentralseröse Retinopathie unter Umständen durch Spironolacton ausgelöst wurde (70).

Ein Patient mit rezidivierender Polypoidaler choroidaler Vaskulopathie (PCV), welche auch im Rahmen der exsudativen AMD auftreten kann, wurde mit oralem Eplerenon behandelt. Dies führte zu einer Langzeitremission mit komplett anliegender Retina (17).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

In der Retina finden sich alle Bestandteile eines lokalen RAAS. Der Einfluss des RAAS auf verschiedene Pathomechanismen retinaler Erkrankungen konnte bereits nachgewiesen werden und retinale Neovaskularisationen sowie subretinale Flüssigkeit wurden in Einzelfällen schon erfolgreich durch den Einsatz von Komponenten wie Spironolacton und Angiotensin II therapiert. Vor allem Neovaskularisationen und Angiogenese werden beeinflusst. Der pathophysiologische Einfluss des RAAS, insbesondere von Aldosteron, auf CNV im Rahmen der exsudativen AMD oder laserinduzierte CNV im Mausmodell ist jedoch bisher vernachlässigt worden. Die bisherigen Forschungsergebnisse legen eine Beeinflussung der Pathologie der CNV in der AMD nahe. Durch das moderate Nebenwirkungsprofil und die Möglichkeit der langfristigen oralen Einnahme wäre Spironolacton bzw. Eplerenon eine hervorragende Ergänzung der bereits bestehenden Therapieansätze. Für andere retinale Krankheiten ist der positive Effekt auf Leakage und retinale Flüssigkeit bereits in randomisierten Studien nachgewiesen worden. Für die Altersbedingte Makuladegeneration soll diese Grundlagenarbeit einen Weg zu neuen Therapiealternativen aufzeigen (142).

Ziel dieser Studie ist es den Einfluss und die Wirkweise von Aldosteron und dem Antagonisten Spironolacton auf choroidale Neovaskularisationen der Altersabhängigen Makuladegeneration am Tiermodell zu untersuchen.

Dazu wurde zunächst der klinische Einfluss der täglichen Applikation auf das Mausmodell der laserinduzierten CNV in Mäusen untersucht. Die zur Diagnostik der AMD etablierten und gut objektivierbaren Methoden FAG und OCT dienten zur Beurteilung des Effektes von Aldosteron und Spironolacton auf die **klinische Ausprägung und Morphologie** des Laserherdes.

Des Weiteren galt es im Falle eines klinischen Korrelats die Ursache, also den pathophysiologischen Effekt des Aldosterons, weiter zu ergründen. Haben Aldosteron und Spironolacton einen Einfluss auf die **Blut-Retina-Schranke** und den Stoffaustausch, die **Angiogenese** sowie auf den **oxidativen Stress** der Retina im Rahmen der CNV?

Explorativ konnte durch Immunhistochemische Untersuchungen der Mäuseretina der Einfluss auf die Blut-Retina-Schranke, den Wasserhaushalt sowie angiogene Prozesse beleuchtet werden. Untersucht wurden essentielle Proteine der Blut-Retina Schranke, die wesentlich für

die Eigenschaften der Adherens- (VE-Cadherin) und Tight-Junctions (Claudin-5) sowie für den Stofftransport (Aquaporin-4, Vimentin, GLUT-1) sind. Die Auswirkungen auf Angiogenese und Inflammation wurden durch immunhistochemische Untersuchungen des Einflusses auf VEGF und Isolektin B4 qualitativ untersucht. Quantitativ wurden die Mechanismen der Aldosteronwirkung auf Angiogenese und oxidativen Stress anhand von Fluorescence-activated cell sorting (FACS)-Proliferationsassays humaner Retinaendothelzellen beleuchtet. Das Verhalten der Zellen unter Einfluss von Spironolacton und Aldosteron sowie der Effekt von oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wurde hier dargestellt.

2 Material und Methoden

2.1 Mausmodell der Laserinduzierten Neovaskularisation

Die Bruchsche Membran trennt die Choroidea und die Retina voneinander. Bei Zerstörung durch Argon-Laserstrahlen wird das Einwachsen choroidaler Gefäße möglich. Dobi et al berichteten bereits 1989, dass durch Laserstrahlen ausgelöste Läsionen der Retina an dieser Stelle zu choroidalen Neovaskularisationen durch Lücken in der Bruchschen Membran führten. Auch Leckage konnte an diesen Neovaskularisationen schon nachgewiesen werden (49). Der Prozess ist in Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung in Abbildung 7 dargestellt. Seither ist die laserinduzierte CNV ein valides Modell für die in der feuchten AMD auftretenden in die Retina einwachsenden choroidalen Neovaskularisationen.

Mithilfe moderner Angiographie und OCT Techniken ist die Darstellung der Laserherde mit den induzierten Neovaskularisationen und Leckagen möglich. Hierbei können durch Nutzung spezieller Einstellungen und Linsen dieselben Geräte wie für humane Untersuchungen im klinischen Alltag mit der gleichen Genauigkeit eingesetzt werden (4).

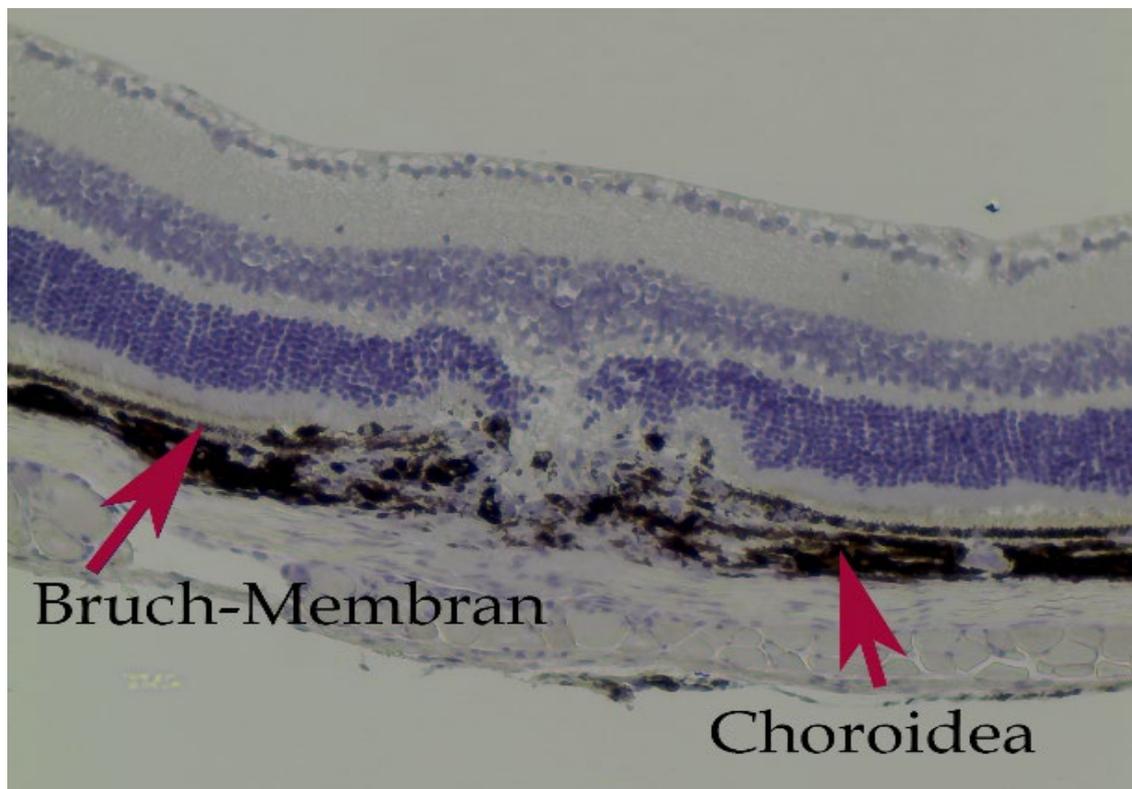


Abbildung 7 HE-gefärbter LH mit durchbrochener Bruchschen Membran

2.1.1 Material

Die im Rahmen der Laserbehandlung und des In-Vivo-Imagings verwendeten Geräte und Softwareprodukte (Tabelle 18), Lösungen und Reagenzien (Tabelle 19) sowie Verbrauchsartikel (Tabelle 20) sind im Anhang aufgeführt.

2.1.2 Versuchstiere und Genehmigung

Mäuse der Linie C56/BL5J haben eine gut beurteilbare Retina und sind daher optimale Versuchstiere für die Induzierung von Neovaskularisationen.

Alle Versuchstiere stammen aus der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) Münster oder über die ZTE von Charles River. Für die Versuche wurden ausschließlich weibliche Tiere im Alter von 8-12 Wochen verwendet, um alters- oder geschlechtsspezifische Einflüsse auf die Versuchsergebnisse zu vermeiden.

Die Tiere lebten während des gesamten Versuches in der Maushaltung der Forschungslabore der Augenklinik Münster. Die Mäuse wurden in Tecniplast Plastik Käfigen unter regulierter Temperatur und Belüftung durch die Tecniplast Smart Flow-Anlage gehalten. Ein normaler Tag-Nacht-Rhythmus für die Tiere war durch die automatische Beleuchtung gegeben.

Die Versuche wurden nach dem Tierschutzgesetz TierSchG unter dem Aktenzeichen AZ 84-02.04.2016.A395 genehmigt.

2.1.3 Versuchsaufbau

Die Versuche wurden in drei Gruppen (Aldosteron (A), Spironolacton (S), Kontrolle (K)) mit je vier Tieren pro Gruppe durchgeführt.

Am Tag vor der Laserbehandlung (d-1) fand die erste Injektion mit der jeweiligen Substanz statt. Die Tiere wurden täglich gewogen, da die Behandlung mit gewichtsadaptierten Konzentrationen (Spironolacton 25 mg/kg/KG, Aldosteron 50µg/kg/KG), analog zu einer Studie von Wilkinson-Berka et al, erfolgte (177). Spironolacton und Aldosteron waren in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und wurden mit Olivenöl auf die benötigte Konzentration verdünnt. Als Kontrolle wurde die gleiche Menge DMSO in Olivenöl verwendet. Durch die lipophilen Eigenschaften der Substanzen ist eine gute Penetration der Blut-Retina-Schranke gegeben (18). Die subkutane Injektion wurde täglich in der Nackenfalte vorgenommen (siehe Abbildung 8).



Abbildung 8 subkutane Injektion in die Nackenfalte

Am Tag 0 erfolgte die Laserbehandlung. Nach drei bzw. vierzehn Tagen nach Laserbehandlung (days post laser = dpl) wurde an zwei Tieren je Gruppe das in vivo Imaging, also FAG und OCT, durchgeführt. Am Tag darauf wurden die Tiere durch Isoflurannarkose und Genickbruch getötet und die Augen enukleiert um immunhistochemische Untersuchungen durchzuführen. Für den genauen Aufbau der Gruppen siehe Tabelle 21 im Anhang.

2.1.4 Laserbehandlung

Alle Mäuse wurden durch gewichtsadaptierte (siehe Tabelle 23 Gewichtsadaptiertes Injektionsvolumen bei intraperitonealer Ketaminanarkose Tabelle 23 im Anhang) intraperitoneale Injektion (siehe Abbildung 9) der oben genannten Ketamin-Xylazin Injektionslösung in eine Kurznarkose versetzt, welche ca. 30 Minuten dauerte.

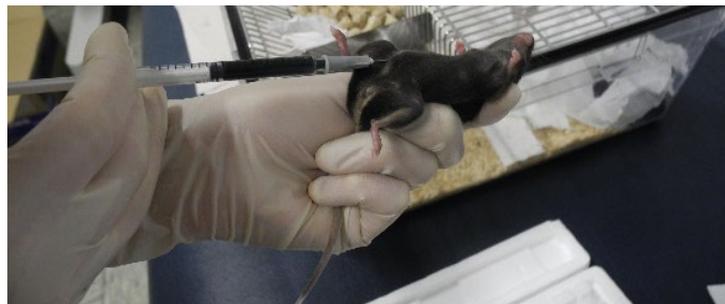


Abbildung 9 Intraperitoneale Injektion

Die Narkose verringerte einerseits den Stress des Tieres, andererseits verhinderte sie sowohl Bewegungen als auch den Lidschluss der Mäuse während der Laserbehandlung.

Anschließend wurde durch Neosynephrin 5% und Zyklotol Augentropfen eine Mydriasis herbeigeführt und mit Proparacain 1% Augentropfen die Augen zusätzlich lokal anästhesiert. Während der Narkose kann aus Unterkühlung der Mäuse eine Trübung der Linse resultieren. Die Häufigkeit, Geschwindigkeit und Ausprägung der kälteinduzierten Katarakt sind

proportional zur Temperatur. Daher ist es für gute Untersuchungsbedingungen und Beurteilbarkeit der Retina essentiell die Mäuse während der Untersuchung/Behandlung mit ausreichend Wärme zu versorgen (14).

Daher sollten die narkotisierten Mäuse optimaler Weise in der Hand oder auf einem Kirschkernkissen bis zur Behandlung/Untersuchung gewärmt werden.

Zur Behandlung wurde die Maus vor dem Laser abgelegt und das Auge mit Methocel auf einem Objektträger in die richtige Position gebracht. Mit dem Argon Laser wurde die Retina fokussiert

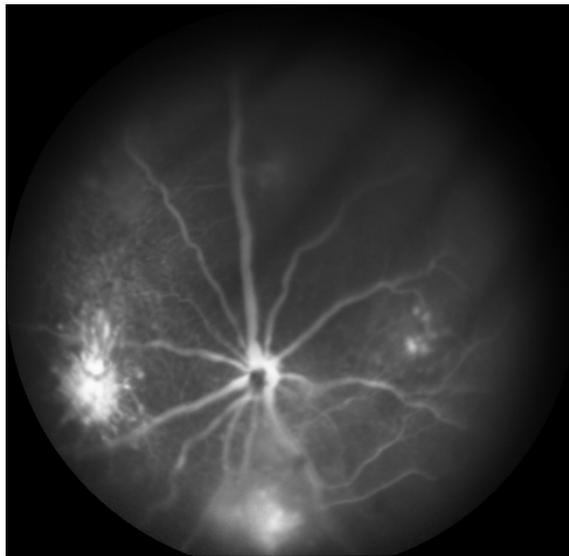


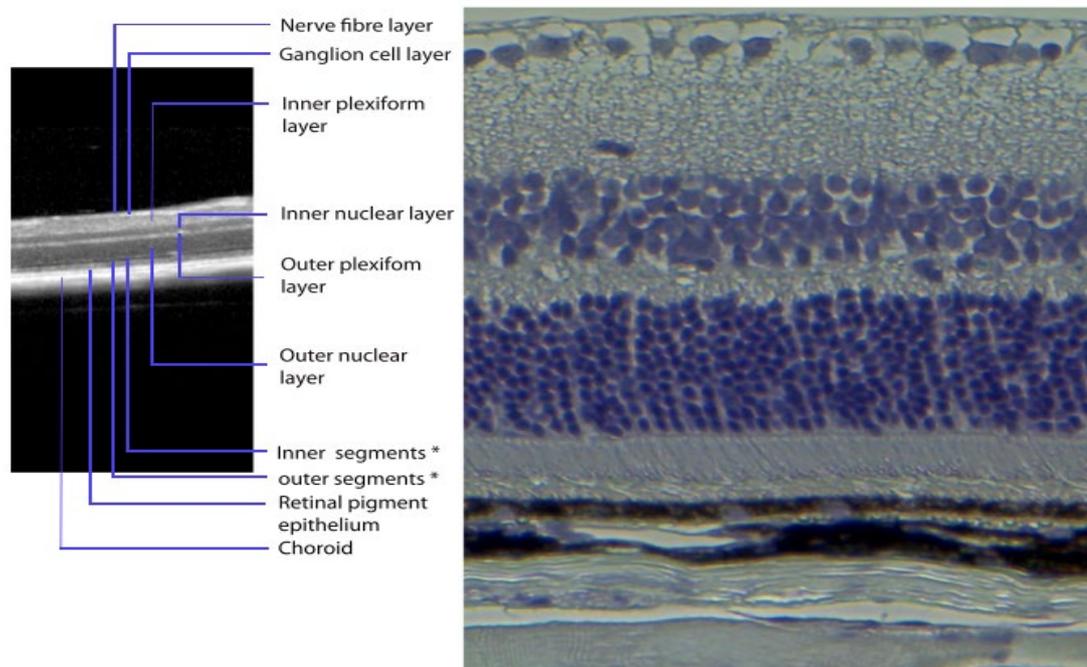
Abbildung 10 FAG der 4 LH eines Mauseauges

und an 4 Stellen, etwa bei 12, 3, 6 und 9 Uhr die Bruchsche Membran mit einem Laserstrahl von $75\mu\text{m}$ (Dauer 100ms, Energie 200mW) behandelt und dadurch unterbrochen. Die Übersichtsaufnahme der Retina in Abbildung 10 zeigt die Verteilung der Laserherde (LH). Durch die Begrenzung auf vier LH wird eine Überschneidung der LH und CNV verhindert. Nach der Laserbehandlung bildete sich über diesen Stellen eine kleine Blase. Bei Beendigung der Untersuchung dauerte die Narkose zumeist weitere 15 min. Für diese Zeit wurde die Kornea mit Bepanthen Augensalbe oder Visco Tears Augen Gel vor Austrocknung geschützt und die Tiere zum Aufwachen wieder in die Käfige überführt.

2.2 In Vivo Imaging

2.2.1 Optische Kohärenztomographie

Die optische Kohärenztomographie ermöglicht bereits in vivo schnittbildähnliche Darstellungen der Retina und Choroidea. Diese nichtinvasive Methode, die keinen direkten Kontakt mit dem Auge benötigt, ermöglicht durch Auswertung von Niederkohärenz-Interferometrie und deren optischer Streuung eine zweidimensionale Ansicht von Gewebebinnenstrukturen (89). Für eine Zuordnung der verschiedenen Schichten siehe Abbildung 11.



* of the Photoreceptors

Abbildung 11 OCT und histologischer Schnitt (HE-Färbung) durch die Maus-Retina

OCT-Scans sind auch für experimentelle Mausmodelle zur Beobachtung retinaler und subretinaler Prozesse als sensitive nicht-invasive Methode geeignet (111). Dabei ist es ähnlich sensitiv und genau wie die histologische Analyse, kann aber schon in vivo vorgenommen werden und erlaubt mehrfache Messzeitpunkte an einem Tier (13).

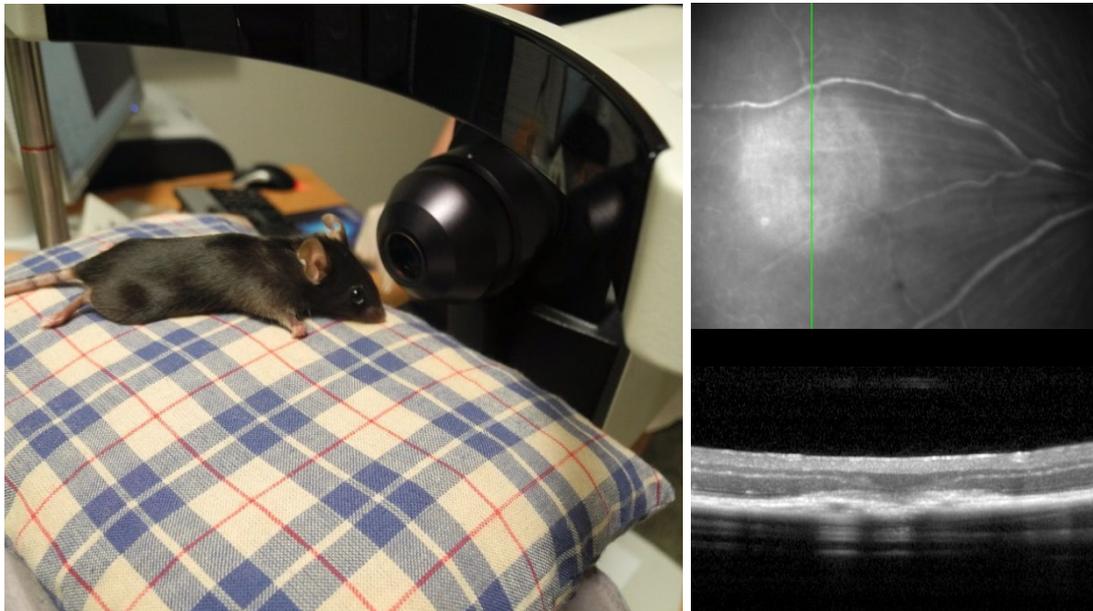


Abbildung 12 Maus vor dem Heidelberg Spectralis HRA-OCT (links), Infrarotbild und OCT (rechts)

Der Mäusebulbus ist mit ca. 3,02 mm im Verhältnis zum durchschnittlich 23,5 mm langen menschlichen Augapfel deutlich kleiner. Zusätzlich besitzt die Linse der Maus mit circa + 35 Dioptrien eine deutlich höhere Brechung als die menschliche. Diese anatomischen Unterschiede können durch eine zusätzliche Linse von +25 Dioptrien am OCT-Gerät und durch Anpassung der Einstellungen im OCT Debug Window ausgeglichen werden, sodass die Nutzung handelsüblicher Geräte möglich wird (3).

Die Anästhesie der Mäuse, die Herbeiführung der Mydriasis sowie die Behandlung der Mäuse vor und nach der Untersuchung erfolgten analog zur Laserbehandlung. Zur Prophylaxe einer kälteinduzierten Katarakt verblieben die Mäuse während der Untersuchung auf einem angewärmten Kirschkernkissen. Jede Maus wurde einzeln vor die Linse des Heidelberg Spectralis OCTs gelegt und die Laserherde im Infrarotbild fokussiert (siehe Abbildung 28 und Abbildung 12). Wahlweise konnten nun ein Volumenscan oder einzelne Schnittbilder angefertigt werden. Zur Auswertung wurde jeweils ein Schnitt durch das Zentrum des Laserherds verwendet. Mithilfe der Software Heidelberg Eye Explorer (Version 1.7.1.0) konnten in diesen Bildern die zentrale Dicke der Retina im LH, die CNV und der zentrale Durchmesser des LH bestimmt werden.

Die CNV wurde, falls vorhanden, in dem Programm umfahren. Analog zu Liu et al wurde die CNV als das spindelförmige, subretinale, hyperreflektive Gewebe über dem RPE definiert (113). Daraus konnte ein Volumen errechnet werden. Die choroidale Neovaskularisation wurde nur 14 Tage nach Laserbehandlung beurteilt.

Für den Durchmesser des Laserherdes bestimmten wir die Länge der unterbrochenen Bruchschichten Membran. Waren mehrere Bilder eines Laserherdes vorhanden, wurde der Mittelwert gebildet.

Diese Werte können gut zum Vergleich zwischen den Mäusegruppen verwendet werden, sind aber nicht wie beim Menschen als exakte Messungen zu verstehen. Durch die oben genannten anatomischen Unterschiede entsteht bei Längenmessungen allerdings ein Wert, der nach unten vom realen Wert abweicht. Durch Multiplikation der erhaltenen Werte mit dem Faktor 1,44 kann die Differenz behoben werden. Dies macht Gegenüberstellungen mit anders geformten Augen möglich (2).

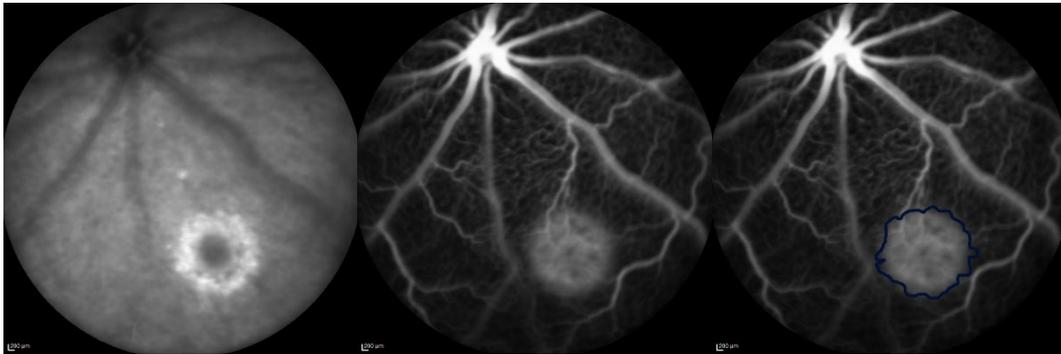
2.2.2 Fluoreszenzangiographie

Die Fluoreszeinangiographie (FAG) ermöglicht es durch die molekularen Eigenschaften des Farbstoffes, die Integrität der Blut-Retina-Schranke zu evaluieren sowie CNV darzustellen. Bei intakter BRS kann der Farbstoff nicht bis in die Retina vordringen, sondern wird durch das Retinaendothel innerhalb der retinalen Gefäße gehalten. Zudem schützt das RPE die Retina vor Fluoreszeineinstrom aus dem Choroid. Bei beschädigter BRS kommt es zu Leckage – Fluoreszeinaustritt in die Retina – welche mit dem Heidelberg Spectralis OCT dokumentiert werden kann.

Die FAG erfolgte wie das OCT am Heidelberg Spectralis OCT. Die Mäuse wurden wie oben beschrieben anästhesiert, getropft und versorgt.

Nach erfolgter Anästhesie wurden die Versuchstiere gewogen und erhielten eine gewichtsadaptierte intraperitoneale Injektion 2%iger Fluoreszein-Natrium-Lösung in der Dosierung 5ml/kg. Danach wurden die Mäuse unverzüglich vor die Linse des Heidelberg Spectralis OCT gebracht. Messungen an beiden Augen wurden zur Beurteilbarkeit von Leckage aus den retinalen Gefäßen in der Frühphase (bis 5 Minuten nach Injektion) und in der Spätphase (5-10 Minuten nach Injektion) der Kontrastmittelanflutung durchgeführt. Im Falle von Barrierestörungen der Gefäße, bspw. an einem Laserherd mit Neovaskularisation, kommt es durch einen Fluoreszeinaustritt aus dem Gefäß zu einer Erhöhung der Fluoreszenz in diesem Bereich. Die Methode bietet die Möglichkeit choroidale und retinale Neovaskularisationen darzustellen, sowie die Qualität der Gefäße in Bezug auf

Barrierefunktion und Integrität zu beurteilen. Dies wird in der Regel qualitativ durch subjektive Beurteilung und Grading Systeme analysiert. Wir entwickelten zur Objektivierung eine quantitative Methode.



*Abbildung 13 Auswertung der Fluoreszenzangiographie eines Laserherdes
(Links: Infrarotbild, Mitte: FAG-Bild, Rechts: FAG-Bild mit umrandetem LH)*

Die Auswertung der Bilder erfolgte mithilfe von Photoshop (CC 2013). Das Heidelberg Spectralis OCT erzeugt immer simultan ein Infrarotbild und ein Bild der Fluoreszenzaktivität. Im Infrarotbild konnte mithilfe der Photoshop Werkzeuge der Laserherd genau umkreist werden. Diese Schablone wurde nun verwendet um im Fluoreszenzbild in einer darübergelegten Ebene den Laserherd und damit die zu untersuchende Fläche zu markieren. In diesem Bereich wurde sowohl die Intensität der Fluoreszenz als auch die Größe der Läsion gemessen. Als Maß für die Größe der Laserherde konnte die Pixelanzahl in dem umschriebenen Bereich genutzt werden (siehe Abbildung 13). Die Fluoreszenz kann mit Photoshop als Helligkeit im Histogramm-Fenster abgelesen werden. Bei Schwarz-Weiß-Bildern kann dort für ein ausgewähltes Areal der Farb-Mittelwert der Graustufen abgelesen werden, wobei die Werte von 0 (Schwarz) bis 255 (reines Weiß) reichen. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) kann also hier durch die Helligkeit des Laserherdareales im Schwarz-Weiß-Bild dargestellt werden. Für die verschiedenen Phasen der Fluoreszenz war die Anfertigung mehrerer Bilder pro Laserherd nötig. Generell wird von einer Frühphase innerhalb der ersten fünf Minuten und einer Spätphase fünf bis zehn Minuten nach Fluorescein-Injektion unterteilt. Bei intravenöser Injektion beim Menschen flutet das Fluorescein während der Frühphase in den retinalen Gefäßen an. Zunächst werden die arteriellen retinalen und choroidalen Gefäße hervorgehoben, dann die venösen. In der Spätphase kommt es bereits zum Abklingen der Fluoreszenzaktivität (48). Bei der Maus kommt es aufgrund der intraperitonealen Injektion

zu einer leicht zeitverzögerten Anflutung, sodass besonders in der Spätphase eine Fluoreszenz der retinalen und choroidalen Gefäße imponiert. Für die Auswertung wurden beide Phasen getrennt voneinander bewertet.

Die Fluoreszenzmessungen wurden also für jede Phase in einem neuen Bild durchgeführt. Die Größe des Laserherdes ist allerdings nicht von der Anflutungsphase des Fluoreszeins abhängig. Daher wurde aus den zu den verschiedenen Zeitpunkten gemessenen Pixelzahlen des Laserherdes der Mittelwert gebildet und für die Berechnung verwendet.

Zusätzlich wurde für jeden Laserherd der Faktor aus der Fläche und der Fluoreszenz gebildet, um einen Parameter für die Gesamtpathologie des Laserherdes beurteilen zu können.

Dies geschah analog zu den von uns etablierten Methoden zur quantitativen Auswertung der FAG (2).

2.2.3 Statistische Auswertung

Alle statistischen Auswertungen konnten mithilfe des Statistikprogrammes SPSS durchgeführt werden. In den meisten Datensätzen konnte die Normalverteilung aufgrund der Schiefe nicht vorausgesetzt werden. Zur Erhöhung der Belastbarkeit der Ergebnisse wurden somit für alle Datensätze nur Tests durchgeführt, welche auch im Falle eines nichtnormalverteilten Auswertungsbereiches valide und belastbare Ergebnisse bringen. Im Falle der OCT – und FAG – Versuche erfolgte der Vergleich aller Gruppen durch den Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben für jeden Zeitraum. Sobald die Nullhypothese verworfen, also ein Unterschied zwischen diesen Gruppen detektiert wurde, folgte der paarweise Vergleich mithilfe des Mann-Whitney-U-Testes. Das Signifikanzniveau betrug für alle statistischen Tests 0,05. Es wurden stets die zweiseitigen Exakten p-Werte berücksichtigt. Sobald das Programm diesen innerhalb eines vordefinierten Zeitabschnitts nicht errechnen konnte wurde die asymptotische Signifikanz verwendet.

Die durchgeführten statistischen Berechnungen sind nicht bezüglich multiplen Testens adjustiert worden. Dies muss bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

2.3 Immunhistochemische Methoden

2.3.1 Material

Die für die immunhistochemischen Methoden verwendeten Materialien, Reagenzien und Antikörper sind tabellarisch im Anhang aufgeführt (Tabelle 24, Tabelle 25, Tabelle 26).

2.3.2 E nukleation

Zur immunhistochemischen Untersuchung der Mäusebulbi war die E nukleation und damit die Tötung der Mäuse notwendig. Die Färbungen wurden an den Mäusen durchgeführt, welche zuvor auch im In Vivo Imaging untersucht wurden.

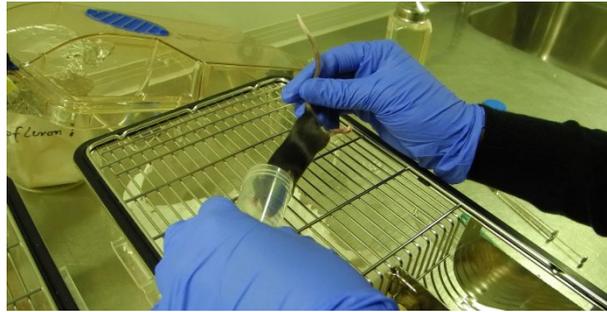


Abbildung 14 Isoflurannarkose

Ein mit Isofluran getränktes Tuch wurde in einem 50 ml Falcon oder ein 1 l Becherglas gegeben und damit in diesem Falcon ein Narkoseaerosol hergestellt. Durch das Isofluran wurden die Mäuse zunächst narkotisiert und durch belassen in dem Narkosegas getötet (siehe Abbildung 14). Das Erlöschen aller Reflexe löst im Falle des eingetretenen Todes eine Miktion aus. Daran kann erkannt werden, wann die Maus lange genug dem Isoflurangas ausgesetzt war. Anschließend wurde zusätzlich zur Sicherheit eine kraniocervikale Dislokation durchgeführt.

Ohne Verzögerung wurde die E nukleation angeschlossen. Mit einer Pinzette oder zwei Fingern wurde Druck auf die Orbitae ausgeübt, wodurch der Augapfel der verstorbenen Maus aus der Orbitahöhle herausgedrückt wird. Mit einer Pinzette kann nun der Sehnerv proximal des Bulbus gegriffen werden. Proximal der Pinzette wurde mit einer Schere der Sehnerv durchtrennt und das Auge direkt in Formaldehyd zur Fixierung vor Paraffineinbettung überführt.

2.3.3 Herstellung von Paraffinschnitten

Die Fixierung der entnommenen Augen erfolgte in 4% Paraformaldehyd in Eppendorf Gefäßen bei 4 °C für eine Woche.

Zur Einbettung wurden die Augen einen Tag und über Nacht unter mehrmaligem Wechseln der Flüssigkeit in Ethanol 70% inkubiert. Am zweiten Tag durchliefen die Augen eine aufsteigende Alkoholreihe nach dem in Tabelle 26 im Anhang aufgeführten Schema:

Die Eppendorfgefäße mit den Augen in den verschiedenen Lösungen wurden mithilfe eines Rotators über den gesamten Prozess hinweg in Bewegung gehalten. Die Augen wurden danach für die verbleibenden Schritte in Eindeckkassetten überführt.

Am dritten Tag verblieben die Augen für 6-8 h unter mehrmaligem Wechsel in Xylol und wurden über Nacht in Paraffin bei 60 °C gelagert.

Am vierten Tag der Einbettung wurden die Augen nochmals zwei Stunden in frischem Paraffin inkubiert und dann am Einbettautomaten in die Kassetten gegossen. Die Augen wurden jeweils mit Blickrichtung (Sehnerv-Pupillen-Achse) parallel zum Boden und zu den Außenkanten ausgerichtet um einen optimalen Schnitt durch das Auge zu bekommen. Danach erfolgte die Lagerung der Blöcke bei 4 °C im Kühlschrank, bis sie am Mikrotom geschnitten und auf Objektträger übertragen wurden (siehe Abbildung 15). Nachdem die Schnitte auf der Heizplatte getrocknet waren wurden sie bis zur Färbung in Objektträgerkasten gelagert.

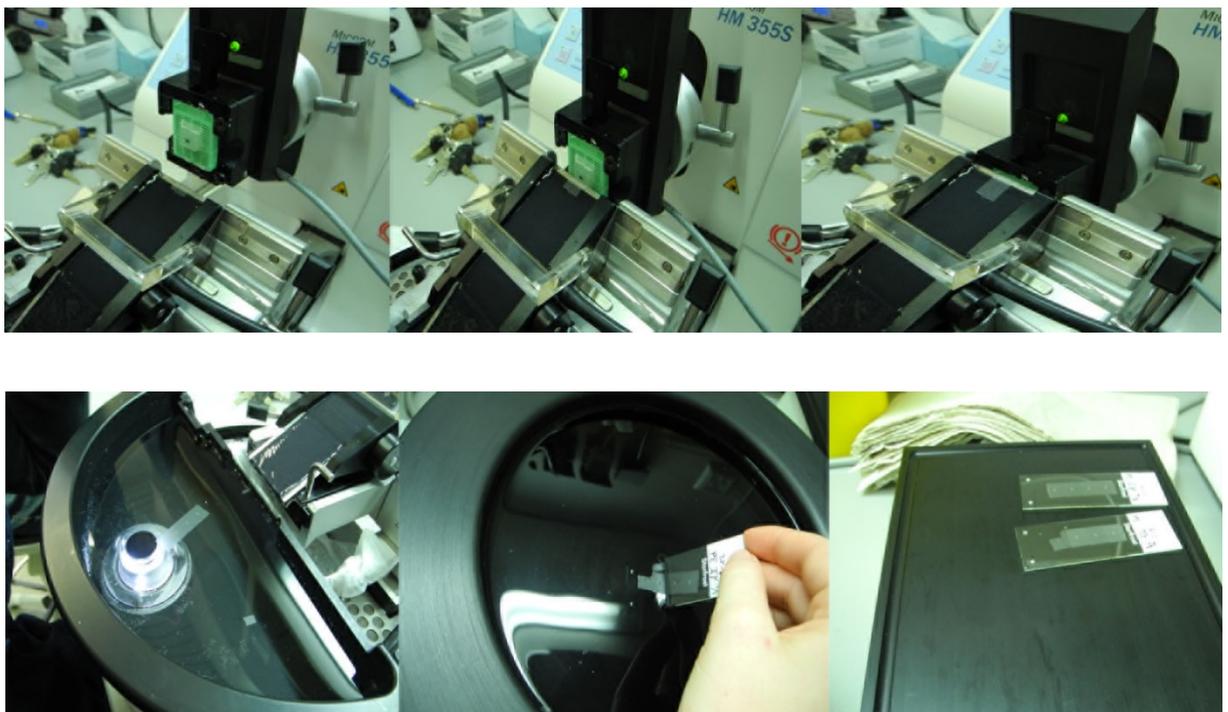


Abbildung 15 Herstellung von Paraffinschnitten am Mikrotom

2.3.4 Immunfluoreszenzfärbung

Färbungen erfolgten immer an Schnitten, welche aus der Mitte der entsprechenden Laserherde stammten. Die Entparaffinierung wurde nach dem in Tabelle 27 (Anhang) aufgeführten, standardisierten Schema einer absteigenden Alkoholreihe durchgeführt.

Der Färbekasteneinsatz mit den Objektträgern wurde nun in ein Gefäß mit Citratpuffer gestellt. Der Behälter wurde im Dampfgerar für 40 Minuten erhitzt. Nach einigen Minuten Auskühlen wurden die Objektträger in eine Stehküvette überführt und dreimal für 5 Minuten mit Phosphate-buffered-Saline (PBS) Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger getrocknet und die zu färbenden Schnitte mit dem Fettstift DAKO Pen umkreist. Die weitere Färbung erfolgte in der Feuchtkammer.

Um unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden wurden die Schnitte mit jeweils 50 µl 1:10 verdünnter Power Blocklösung vorbereitet. Nach genau 6 Minuten Einwirkzeit wurde dieser abgeklopft und Reste mit Aqua dest. abgespült. Hiernach erfolgte eine erneute Spülung mit drei fünfminütigen Zyklen in PBS. Die getrockneten Objektträger wurden danach wieder in die Feuchtkammer gelegt. Nun wurden die ersten Antikörper in oben genannter Verdünnung in 50µl 1% igem Bovinem Serum Albumin (BSA) pro Schnitt aufgebracht. Pro Objektträger diente ein Schnitt als Negativkontrolle. Dort wurde anstatt einer Antikörper-BSA-Verdünnung nur BSA-Lösung aufgetragen. So wurden die Schnitte in der Feuchtkammer für 20h bei 4°C inkubiert.

Am zweiten Tag wurden die überschüssigen, nicht gebundenen Erstantikörper mit drei Zyklen PBS für fünf Minuten entfernt. Nachdem die Objektträger trocken gewischt wurden konnte der zweite Antikörper ebenfalls in 50 µl BSA-Lösung mit Antikörper je Schnitt, auch auf die Negativkontrolle, aufgetragen werden. Alle Schritte mit den fluoreszierenden Zweitantikörpern wurden in größtmöglicher Dunkelheit durchgeführt.

Die Zweitantikörper wurden nach einer Stunde abgespült und die Färbung mit 50 µl 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) abgeschlossen. Die DAPI Färbung verblieb 8 Minuten auf den Objektträgern und wurde danach sofort mit Aqua dest abgespült. Nach erneutem Spülen in der PBS gefüllten, mit Alufolie abgedunkelten Stehküvette für drei mal fünf Minuten konnten die Objektträger getrocknet und mit Immu Mount und Deckgläsern eingedeckelt werden.

Alle Antikörper wurden in den in Tabelle 24 beschriebenen Verdünnungen verwendet. Die Verdünnung erfolgte stets mit BSA-1% in Aqua dest.

Innerhalb der nächsten zwei Wochen konnten mithilfe des Fluoreszenzmikroskopes Bilder in den einzelnen Farbkanälen gemacht und auch als Kombinationsbild abgespeichert werden. Alle immunhistochemischen Färbungen wurden zwei bis vier Mal an unterschiedlichen Laserherden aus unterschiedlichen Versuchen wiederholt.

2.3.5 Statistische Methoden

Die Auswertung der immunhistochemischen Versuche erfolgte rein qualitativ. Drei unabhängige, qualifizierte Beobachter beurteilten die Intensität der Färbungen in den verblindeten Aufnahmen. Es wurden die Kategorien negativ (-), schwach (+), mittel (++), und stark (+++) bei jedem Bild auf die verschiedenen Teilschichten des Augenhintergrundes Ganglienzellen, innere Körnerschicht, äußere Körnerschicht, RPE und Choriokapillaris sowie den Laserherd angewendet.

Berücksichtigt wurden alle reproduzierbaren Unterschiede, welche von der Mehrheit der Untersucher als solche klassifiziert wurden.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Material

Im nachfolgenden Abschnitt ist die Herkunft der verwendeten Zellen (Tabelle 28), Lösungen und Reagenzien inklusive Rezeptur (Tabelle 29) sowie die genutzten Geräte und Softwareprogramme (Tabelle 30) tabellarisch aufgeführt. Die Herkunft der verwendeten Verbrauchsartikel ist in Tabelle 31 verzeichnet.

Während des Versuchansatzes und der Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)-Färbung erfolgte sowohl die Bestimmung der Zellanzahl in Lösung sowie der Allophycocyanin (APC)-Beads-Konzentration mithilfe der in Tabelle 30 erwähnten Neubauer-Zählkammer mit dem Kammerfaktor 10.000. Die Suspension wurde durch vortexen oder mehrmaliges Umdrehen vermischt und 10 µl auf jede Seite der Zählkammer gegeben. Alle Zellen bzw. Beads in den vier vorgezeichneten Quadranten wurden gezählt und der Mittelwert X aus den Werten beider Seiten errechnet. Nun kann durch die Formel

$$\frac{X \times 10.000}{4} \times \text{Volumen der Suspension} = \text{Gesamtanzahl}$$

die Gesamtzahl der Zellen bzw. Beads errechnet werden.

2.4.2 Zellkultivierung

Für alle Versuche wurden humane Retina Endothelzellen (hRECs) verwendet. Die Kultivierung der hREC als adhärenente Monolayer-Kultur erfolgte in 75 cm²-Flaschen. Die

Zellen wurden in 11 ml Medium bei 37°C, einer Konzentration von 5 % CO₂ und maximaler Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert. Das serumreduzierte Medium wurde durch Zugabe von Vascu Life EnGS Life factors für Endothelzellen zu Vascu Life Basalmedium hergestellt (siehe Tabelle 28).

Alle Versuche und auch die Kultivierung erfolgten ohne Antibiotikazugabe unter sterilen Bedingungen unter der Sterilbank.

Vor der Kultivierung wurden die Zellen in DMSO in einem Kryotank mit flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Kultivierung wurde ein Vial mit 5×10^6 Zellen in 1 ml DMSO entnommen und im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Nach dem Auftauen wurde die gesamte Zellmenge in eine vorgewärmte Zellkulturflasche mit 10 ml Medium überführt. Ein Mediumwechsel erfolgte nach 24 h. Bei Erreichen der Konfluenz nach weiteren 48 h wurden die Zellen passagiert. Nach Entfernen des Kulturmediums wurden die Zellen mit 10 ml Dulbeccos PBS ohne Magnesium und Calcium gewaschen und durch Inkubation mit 2 ml TrpLE bei 37 °C vom Untergrund abgelöst. Die Enzymreaktion wurde nach vollständiger Ablösung der Zellen durch Zugabe von 8 ml Kulturmedium (2% FCS) gestoppt. Die Zellkulturflasche wurde mehrmals mit der Zellsuspension gespült und diese dann auf neue Flaschen aufgeteilt.

Alle Oberflächen auf denen hRECs kultiviert wurden mussten zuvor 30 Minuten zur Beschichtung mit Attachement Factor Solution inkubiert werden.

Die Experimente wurden jeweils bei Erreichen der Konfluenz in Passage 7 oder 8 durchgeführt.

2.4.3 Versuchsansatz

Die Versuche wurden jeweils in Dreifachansätzen für drei Zeitpunkte (24 h, 48 h, 72 h) auf 24 Well Platten mit einer Wachstumsfläche von 1,9 cm² je Well durchgeführt. Die 24 Well Platte wurde mit 250 µl Attachement Faktor pro Well 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und somit beschichtet. Der Überstand konnte verworfen werden. 500µl Medium wurden in die Wells vorgelegt, sodass alle Wells nach Zugabe der CFSE-gefärbten Zellen in weiteren 500 µl mit 1 ml Medium befüllt sein würden.

Je nach Versuchsansatz wurden die Substanzen ebenfalls vorgelegt oder am Tag nach der Zellaussaat zugegeben. Als Tag 0 ist dabei immer der Tag der Zugabe von Aldosteron, Spironolacton sowie DMSO bezeichnet.

Für alle Versuche mit Wasserstoffperoxid erfolgte die Zugabe der Substanzen und des Wasserstoffperoxids am Tag nach der Aussaat, für alle übrigen zeitgleich mit der Aussaat

der Zellen.

Als zugegebene Substanzen wurden Aldosteron, Spironolacton und H_2O_2 verwendet. Aldosteron und Spironolacton wurden wie in Tabelle 29 beschrieben in DMSO gelöst, sodass im Grundansatz Aldosteron 1mMolar bzw. Spironolacton 10mMolar vorhanden war. Diese konnten für die Versuchsansätze bis zur gewünschten Konzentration mit Zellmedium verdünnt werden. Als Kontrolle dienten Ansätze mit reinem Zellmedium und Ansätze mit Zellmedium und der höchsten Konzentration DMSO, die in den anderen Ansätzen genutzt wurde – 1 μ l DMSO auf 1 ml Medium.

Wasserstoffperoxid konnte aus der 30%igen Grundlösung mit PBS zur gewünschten Konzentration verdünnt werden. Die in Tabelle 3 aufgeführten Konzentrationen wurden im Verlauf der Versuche immer in dreifachen Ansätzen verwendet.

Substanz	Verwendete Konzentrationen
Aldosteron	100pM, 1nM, 100nM, 1 μ M
Spironolacton	0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 4 μ M
DMSO	1 μ l/ml
H_2O_2	50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M, 250 μ M

Tabelle 3 Für die zellbiologischen Versuche verwendete Substanzen und Konzentrationen

2.4.4 CFSE-Färbung

Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) wurde erstmals 1990 als intrazellulärer Farbstoff beschrieben und ursprünglich zur Beobachtung von Lymphozytenmigration in vivo genutzt (174). Das von Fluorescein abgeleitete Molekül kann aufgrund seiner Lipophilität zelluläre Membranen leicht passieren und wird von Zellen schnell plasmatisch aufgenommen. Intrazellulär spalten Esterasen zwei Acetatgruppen ab. Dies verringert die lipophilen Eigenschaften des Moleküls und hemmt damit die Diffusion aus der Zelle hinaus. Der Succinimidyl-Anteil bindet verstärkt an verschiedene intrazelluläre Moleküle. Mit einem Teil dieser Moleküle verlässt auch der gebundene Farbstoff die Zelle innerhalb der ersten 24 h, der Rest verbleibt im Zytoplasma (135).

Die intrazellulären CFSE-Moleküle werden im Falle einer Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt, sodass diese im Vergleich zur Ausgangszelle halb so viel Fluoreszenzintensität aufweisen. Durchlaufene Proliferationszyklen können daher aus dem Verhältnis der von den Zellen emittierten Fluoreszenz zur anfänglichen Fluoreszenzintensität nach 24 h berechnet werden (117).

Alle Zellversuche wurden mit CFSE-gefärbten Zellen durchgeführt.

Für die Färbung wurden die Zellen mit TrpIE von der Zellkulturflasche gelöst. Hierfür wurden sie nach Entfernung des Mediums und Spülen mit 10 ml PBS fünf Minuten bei 37 Grad mit zwei ml TrpIE inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit fünf ml Medium gestoppt. Die Zellen aus mehreren Flaschen wurden zusammengeführt und in der Eppendorf Zentrifuge 5810 R bei 4 °C und 200 G zentrifugiert. Zur Ernährung der Zellen erfolgte eine Resuspension des Zellpellets in 10 ml Medium. Die Zellzahl wurde mithilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt und die Zellen in PBS in der richtigen Konzentration gelöst. Zur Färbung mit CFSE sollten die Zellen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml vorliegen, sodass 0,1 µl CFSE pro Milliliter Zellsuspension zugegeben werden müssen. Anschließend wurde die Suspension im Vortexer gemischt und 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Beendigung der Reaktion erfolgte mit einem Milliliter Medium je Milliliter PBS. Zweimaliges Waschen mit PBS und anschließendes Zentrifugieren mit Verwerfen des Überstandes entfernte die extrazellulären Reste des Farbstoffes. Die Herstellung einer Suspension der Zellen in Nährmedium in einer Konzentration von 20.000 Zellen pro 500 µl ermöglichte die Verteilung auf die Vorbereiteten Wells mit einer Endkonzentration von 20.000 Zellen in 1 ml Versuchsmedium.

Bei jedem Versuch wurden mit dem FACS-Gerät Ausgangswerte gemessen um eine gleichmäßige Verteilung nachzuweisen. Diese Zellen wurden nicht ausgesät, sondern die 500 µl mit den 20.000 Zellen direkt in FACS-Röhrchen überführt, zentrifugiert bei 4°C und 200G und in 200 µl FACS- Puffer resuspendiert.

FACS-Messungen fanden jeweils 24, 48 und 72 Stunden nach der Zugabe der Substanzen statt. Die Versuchsplatten wurden über den gesamten Versuchszeitraum bei 37 °C im Inkubator gelagert.

Nach Ende des jeweiligen Versuchszeitraumes wurden die Zellen mit 500 µl PBS pro Well gewaschen, mit 200 µl TrpIE pro Well für fünf Minuten abgelöst und die Reaktion mit 800 µl Medium gestoppt. Der Zellüberstand, das PBS und die homogenisierten Zellen in TrpIE und Medium wurden in beschriftete FACS-Tubes überführt und bei 200 G und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 200 µl gekühltem FACS-Puffer resuspendiert.

2.4.5 APC-Beads

Im FACS-Gerät wird immer nur eine kleine Menge der zuvor gut durchmischten Zelllösung analysiert. APC-Beads erlauben aus dem vom FACS-Gerät analysierten Probevolumen Rückschlüsse auf die gesamte Probe zu ziehen.

APC-Beads wurden in FACS-Puffer gelöst und unter stetiger Kontrolle mit der Neubauer-Zählkammer auf eine Konzentration von 1.000.000 Beads pro Milliliter titriert. Diese Suspension konnte bei 4° C gelagert werden. Vor der Applikation im Versuch musste auf eine gute Durchmischung durch den Vortexer geachtet werden. Unmittelbar vor der FACS-Messung wurde die genaue Konzentration der Beads erneut mithilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt.

Jeder Probe wurden ca. 10.000 APC-Beads in 10 µl FACS-Puffer hinzugefügt. Die genaue Konzentration der Beads in der Suspension wurde täglich neu bestimmt, sodass immer die genaue Menge zugegebener Beads für die Berechnungen verwendet wurde. So konnten aus dem Verhältnis der gemessenen Beads im analysierten Probenvolumen zu den gesamten Beads ein Faktor berechnet werden, mithilfe dessen aus den gemessenen Ereignissen die Gesamtzahl der Zellen insgesamt und in den einzelnen Populationen berechnet werden konnte.

Zellpopulation insgesamt

$$= \frac{\text{APC - Beads insgesamt (ca. 10.000)}}{\text{gemessene APC - Beads}} * \text{gemessene Zellpopulation}$$

2.4.6 Hoechst-Färbung

Hoechst 33258 ist ein Fluoreszenzfarbstoff welcher an doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNA) bindet und bei 4 °C nur minimal von lebenden Zellen aufgenommen wird. Somit werden bei dieser Temperatur hauptsächlich frei zugängliche DNA-Moleküle von beschädigten, avitalen Zellen angefärbt (7). Diese Färbung wurde zur Detektion toter Zellen immer erst kurz vor der FACS-Analyse nach Ende des Versuchszeitraumes durchgeführt.

Die nach Anleitung des Herstellers hergestellte Lösung wurde 1:100 verdünnt und 2 µl zu jedem mit 200 µl gefüllten FACS Röhrchen hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei 0-4 °C ist die Färbung abgeschlossen.

2.4.7 Durchflusszytometrie

Die Analyse der Proliferationszyklen wurde mithilfe der Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Durchflusszytometrie erlaubt eine quantitative Analyse einzelner Zellpopulationen in einer Suspension. Diese wird durch das Durchflusszytometer verdünnt und die Zellen einzeln durch einen monochromatischen Laserstrahl geleitet. Der Laserstrahl trifft in einem rechten Winkel auf die singulären Zellen, welche das Licht je nach ihren Eigenschaften unterschiedlich brechen und streuen. Fluoreszenzmarkierungen werden angeregt und leuchten ihrerseits je nach Stärke der Färbung.

Die Lichtstreuung sowie die Fluoreszenzintensität jeder Zelle werden vom Gerät detektiert und in einen Datenspeicher überführt. Dies erlaubt in einem Messvorgang einerseits die Registrierung jeder einzelnen Zelle und ihrer Charakteristika (Größe, Granularität) sowie gleichzeitig die Detektion ihrer jeweiligen Fluoreszenzeigenschaften. Die FACS Diva Software o. ä. speichert die Daten und führt eine Messanalyse durch, welche die Daten tabellarisch und graphisch wiedergibt (150).

Zur besseren Vergleichbarkeit wurde zu jedem Zeitpunkt des Experimentes die gleiche Einstellung des FACS-Gerätes verwendet, welche am Tag 0 des Versuches mithilfe der 0h Werte kontrolliert wurde. Die Einstellungen sind in Tabelle 32 aufgeführt.

Die Proben wurden einzeln nacheinander mithilfe des FACSCanto II gemessen und nach jeder Probe wurde ein SIT-Flush durchgeführt um eine Vermischung der Proben im Gerät und damit eine Verfälschung der Werte zu vermeiden. Vor der Messung wurde jede Probe einige Sekunden im Vortexer gemischt. Von jeder Probe wurden 20.000 Events aufgenommen und die Zellzahlen in Excel ausgewertet.

2.4.8 Statistische Auswertung

Die absoluten Werte der Zellpopulationen konnten wie oben beschrieben mithilfe der gemessenen Beads berechnet werden. Die Proliferationszyklen ergaben sich aus der Mittleren Fluoreszenz Intensität (MFI) der detektierten Zellen. Die logarithmisch abnehmende Intensität wurde in Excel in die absolvierten Proliferationszyklen umgewandelt. Der Logarithmus des ersten MFI-Wertes zur Basis des zweiten MFI-Wertes entsprach den durchlaufenen Proliferationszyklen.

Die endgültige Auswertung erfolgte im Statistikprogramm SPSS. Die Gruppen der einzelnen zugegebenen Substanzen wurden in Bezug auf die zu untersuchenden Parameter Teilungszyklen, lebende Zellen, tote Zellen und Gesamtzellzahl mithilfe nicht parametrischer Tests verglichen. Da bei einigen Zellpopulationen die Schiefe außerhalb des

für parametrische Tests optimalen Bereiches von 1 bis -1 lag und aufgrund der Größe der statistischen Masse erfolgte zur Gewährleistung belastbarer Ergebnisse die Auswertung aller Parameter durch nicht parametrische Tests (Kruskal Wallis und Man Withney U Test). Soweit im Rahmen der Rechenleistung möglich bezog sich das festgelegte Signifikanzniveau von 0,05 auf die zweiseitige exakte Signifikanz, in allen anderen Fällen wurde die asymptotische Signifikanz zur Beurteilung herangezogen.

3 Ergebnisse

3.1 Optische Kohärenztomographie – Strukturelle Einflüsse auf die Retina

Die optische Kohärenztomographie (Heidelberg Spectralis) ermöglichte eine Beurteilung der zentralen Retinadicke im Zentrum des Laserherdes, des Durchmessers des Laserherdes sowie des Volumens der eventuell aufgetretenen choroidalen Neovaskularisation in vivo.

Die Versuchstiere wurden drei und vierzehn Tage nach der Laserbehandlung untersucht. Die aufgeführten statistischen Berechnungen sind nicht bezüglich multiplen Testens adjustiert worden. Dies muss bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

3.1.1 Der Einfluss auf die zentrale Retinadicke

Im Folgenden wird der Einfluss der Antagonisten Aldosteron und Spironolacton auf die zentrale Netzhautdicke im Laser nach drei und nach vierzehn Tagen beschrieben.

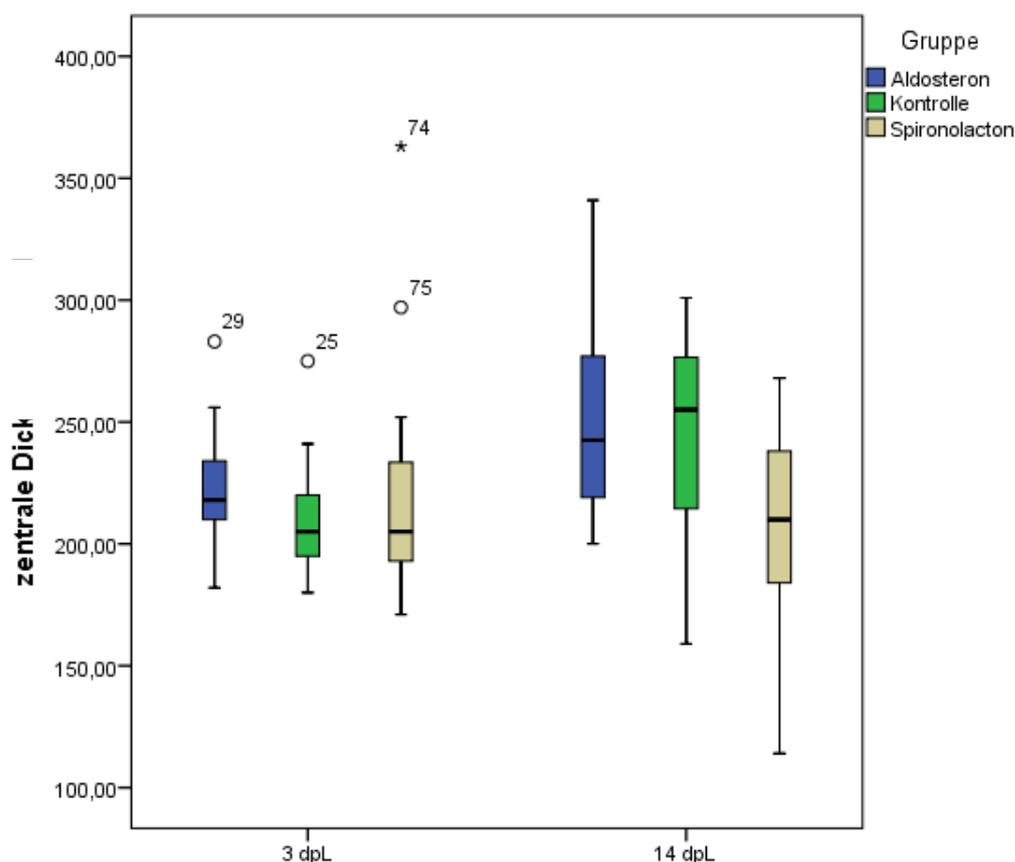


Abbildung 16 zentrale Retinadicke nach drei und vierzehn Tagen postLaser (days post laser – dpl)

Die zentrale Retinadicke wird drei dpl durch Aldosteron signifikant (Mann-Whitney-U-Test $p=0,016$) erhöht. Die zentrale Retinadicke der Kontroll- und Spironolactongruppe bewegten sich auf ähnlichem Niveau mit gleichem Median.

Drei Tage nach der Laserbehandlung lässt sich in der Grafik eine durch Aldosteron vermehrte zentrale Retinadicke verzeichnen. Die Kontrollgruppe sowie die Spironolactongruppe zeigen Werte auf einem sehr ähnlichen Niveau mit gleichem Median. Vierzehn Tage nach Laserbehandlung lässt sich in der Abbildung 16 eine absteigende Tendenz der Wertebereiche der zentralen Retinadicke mit Aldosteron > Kontrolle > Spironolacton erkennen. Besonders auffällig ist die auch im Median stark verminderte Retinadicke nach vierzehn Tagen in der Spironolactongruppe. Die OCT-Bilder sind in Abbildung 17 dargestellt.

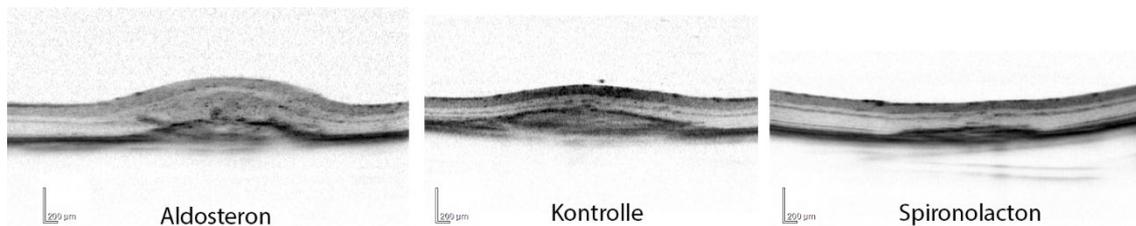


Abbildung 17 Laserherde 14 dpl mit choroidaler Neovaskularisation

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten sich nach 14 Tagen nicht, es lässt sich aber eine Tendenz der zentralen Retinadicke mit Aldosteron > Kontrolle > Spironolacton darstellen. Auffällig ist die im Median verminderte Retinadicke in der Spironolactongruppe.

Für die zentralen Retinadicken ergab sich drei Tage nach der Laserbehandlung ein signifikanter Unterschied (Kruskal-Wallis-Test $p=0,049$) zwischen allen drei Gruppen. Im Rahmen der weiterführenden Testung war die zentrale Retinadicke der Aldosteron-Gruppe signifikant größer als die der Kontrollgruppe (Man-Whitney-U-Test $p=0,016$).

	3 dpl			14 dpl		
	Aldo	Kontrolle	Spiro	Aldo	Kontrolle	Spiro
N	26	25	27	24	24	27
Mittelwert	221,58	208,76	217,63	250,83	245,79	207,59
Maximum	283,00	275,00	363,00	341,00	301,00	268,00
Median	218,00	205,00	205,00	242,50	255,00	210,00
Minimum	182,00	180,00	171,00	200,00	159,00	114,00
Perzentile 25	210,00	195,00	192,00	219,00	214,50	182,00
Perzentile 75	234,00	220,00	240,00	277,00	276,50	244,00
Standard Deviation	20,24	22,29	40,04	38,70	38,80	39,05

Tabelle 4 zentrale Retinadicke im LH in μm (Aldo = Aldosteron, Spiro = Spironolacton)

In den Gruppen, welche die Substanzen über einen Zeitraum von vierzehn Tage nach der Laserbehandlung erhalten hatten, konnten ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen und damit ein Einfluss auf die Retina nachgewiesen werden (Kruskal-Wallis-Test $p=0,001$). Diese wurden in weiterführenden Einzeltestungen untersucht. Die Spironolacton-Gruppe wies in den Einzeltestungen signifikant deutlich geringere Werte als die Kontrollgruppe (Man-Whitney-U-Test $p= 0,001$) sowie die Aldosteron-Gruppe (Man-Whitney-U-Test $p=0,001$) auf.

Die genauen Ergebnisse sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Aldosterongabe führt nach drei Tagen zu einer vermehrten Schwellung der Retina im Laserherd, nach vierzehn Tagen ist dieser Unterschied weniger ausgeprägt. Spironolacton zeigt eine entgegengesetzte Wirkung und reduziert die Retinadicke im Vergleich zur Kontrolle nach vierzehn Tagen.

3.1.2 Laserherddurchmesser

Das OCT konnte bei allen Laserherden eine durchbrochene Bruchsche Membran darstellen. In allen Fällen ist also ein Einwachsen choroidaler Gefäße in retinale Schichten möglich gewesen.

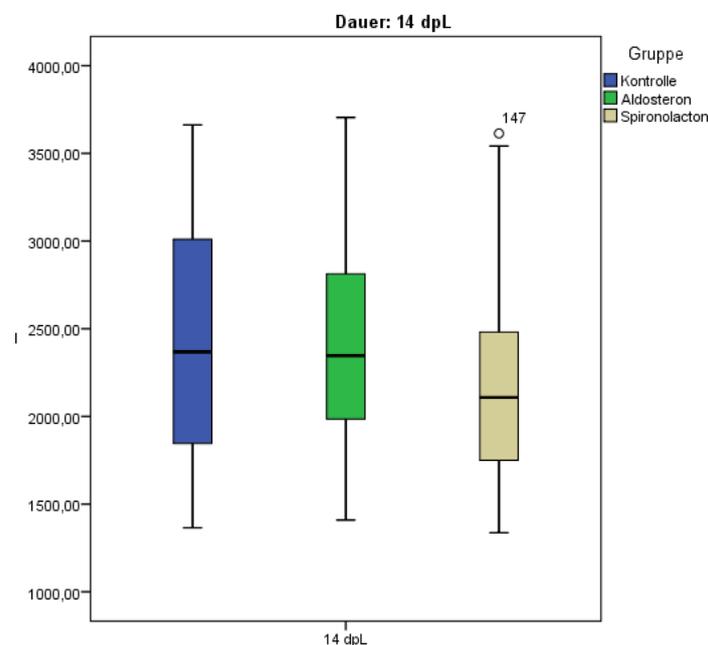


Abbildung 18 Laserherddurchmesser 14 dpl

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ließen sich **nicht** feststellen. Auffällig ist dennoch der tendenziell niedrigere Durchmesser des Laserherdes in der Spironolactongruppe mit niedrigerem Median im Vergleich zu den anderen Gruppen.

Abbildung 18 zeigt die Perzentile und Mediane der Laserherddurchmesser vierzehn Tage nach der Laserbehandlung. Der durchschnittliche Laserherddurchmesser der mit Spironolacton behandelten Tiere stellt sich kleiner dar als in der Kontroll- oder Aldosterongruppe. Es lässt sich eine leichte Tendenz Aldosteron/**Kontrolle** > **Spironolacton** erkennen. Signifikante Unterschiede zwischen den Laserherdgrößen der drei Versuchsgruppen ließen sich allerdings weder nach 3 Tagen (Kruskal-Wallis-Test $p=0,552$) noch nach 14 Tagen (Kruskal-Wallis-Test $p=0,408$) feststellen.

3.1.3 Zeitliche Dynamik der Laserherddurchmesser

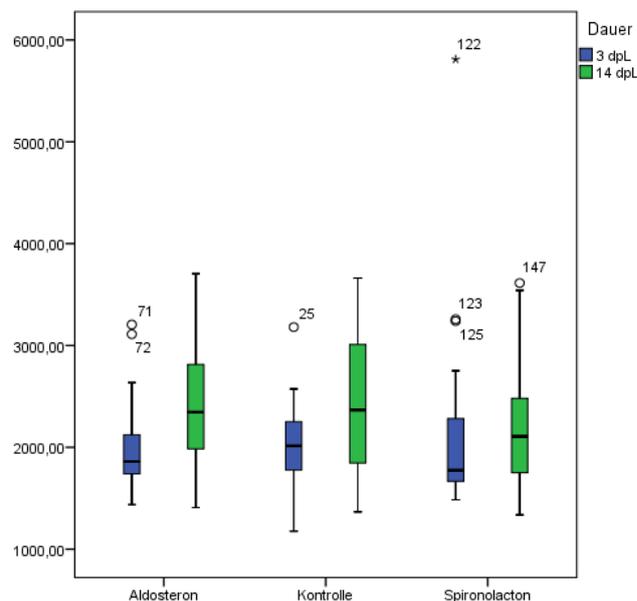


Abbildung 19 Zeitliche Dynamik der Laserherddurchmesser drei bis vierzehn dpl

In der Aldosterongruppe konnte im Zeitverlaufeine signifikante Größenzunahme des Laserherdes gezeigt werden (MWU $p=0,003$). In der Spironolacton- und Kontrollgruppe war dieser zeitliche Unterschied nicht signifikant.

Generell kann wie durch Abbildung 19 beschrieben eine Zunahmetendenz des Laserherddurchmessers mit der Zeit festgestellt werden.

Für Aldosteron ist dieser Unterschied statistisch signifikant (Man Withney U Test (MWU) $p=0,003$). Für Spironolacton und die Kontrolle war dieser Unterschied nicht signifikant (Kontrolle MWU $p=0,07$, Spironolacton MWU $p=0,355$).

3.1.4 Einfluss auf das Volumen der choroidale Neovaskularisation

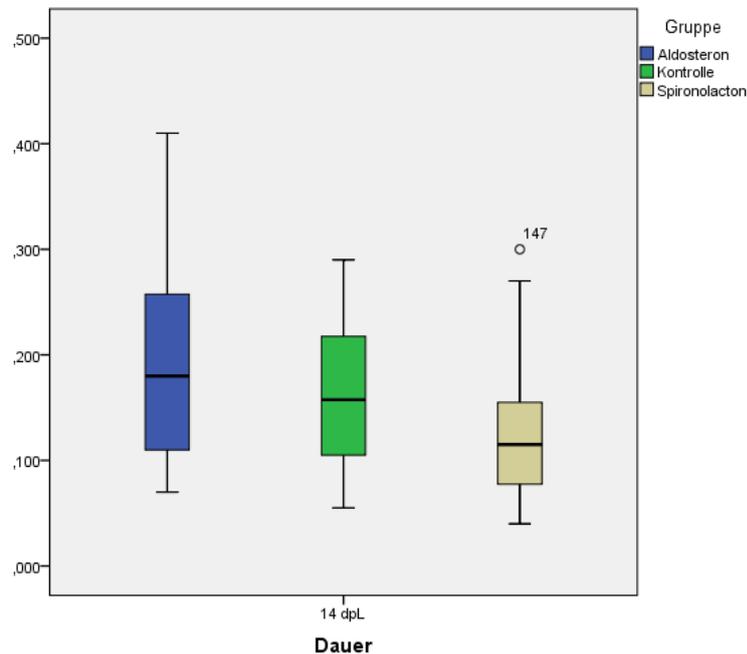


Abbildung 20 CNV nach vierzehn Tagen

Die choroidale Neovaskularisation (CNV) in den Laserherden (LH) der Aldosterongruppe hatte ein signifikant höheres Volumen als die in den LH der Spironolactongruppe ($p=0,008$).

Insgesamt zeigte sich die Tendenz des Volumens folgendermaßen: Aldosteron > Kontrolle > Spironolacton, Spironolacton und Aldosteron wirkten antagonistisch.

Die choroidale Neovaskularisation nach 14 Tagen wurde in 24 Laserherden der Aldosterongruppe, 24 Laserherden der Kontrollgruppe und 27 Laserherden der Spironolactongruppe untersucht (siehe Tabelle 5). Im Kruskal-Wallis-Test konnten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen aufgezeigt werden ($p=0,026$). Zur weiterführenden Betrachtung verglichen wir die Gruppen paarweise mithilfe des Man-Whitney-U-Testes. Die Laserherde der Mäuse, welche mit Spironolacton behandelt wurden, zeigten eine signifikant geringere choroidale Neovaskularisation als die Laserherde der Mäuse der Aldosterongruppe ($p=0,008$). Zur Kontrolle konnte sich keine der beiden anderen Gruppen signifikant abheben. Die Tendenz des Volumens der choroidalen Neovaskularisation Aldosteron > Kontrolle > Spironolacton ist allerdings in der Abbildung 20 anhand der Medianwerte deutlich sichtbar. Somit ist ein Einfluss des RAAS auf die Entwicklung choroidaler Neovaskularisationen anzunehmen. Aldosteron und Spironolacton wirken dabei als Antagonisten. Aldosteron steigert die Neovaskularisation um 13 %, wohingegen sie unter Einfluss von Spironolacton um 27% geringer ausgeprägt ist.

Statistische Parameter	Aldosteron	Kontrolle	Spirolacton
N	24	24	27
Mean	0,19	0,16	0,13
Maximum	0,410	0,290	0,300
Median	0,180	0,158	0,115
Minimum	0,070	0,055	0,040
Perzentile 25	0,110	0,105	0,075
Perzentile 75	0,258	0,218	0,160
Standard Deviation	0,092	0,074	0,072

Tabelle 5 Deskriptive Statistik Volumen der CNV 14 dpi

3.2 Fluoreszenzangiographie

3.2.1 Laserherdgröße

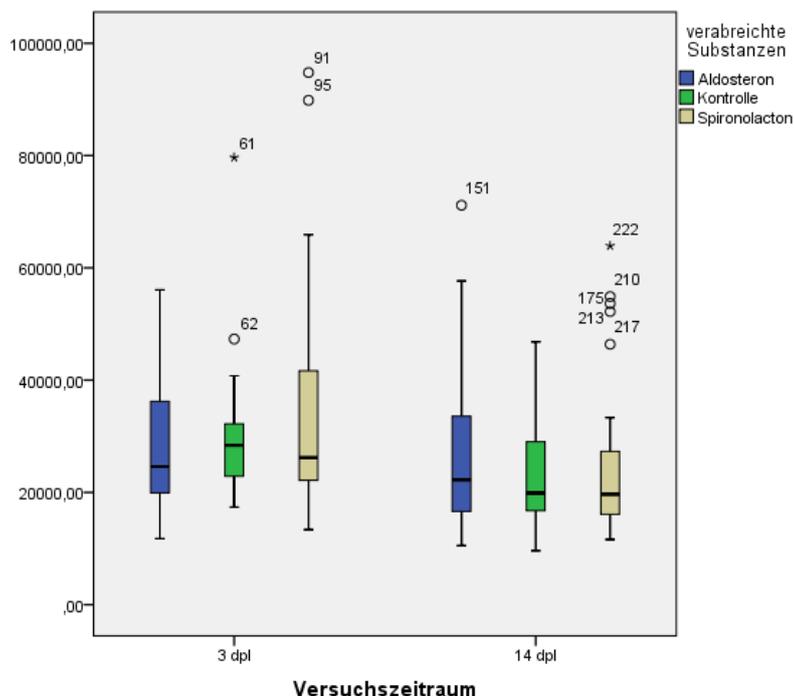


Abbildung 21 Laserherdgröße im Infrarotbild der FAG 3 und 14 dpl

Auch in der Fluoreszenzangiographie konnte kein signifikanter Unterschied in der Laserherdgröße zum gleichen Zeitpunkt zwischen den Substanzgruppen nachgewiesen werden.

Allerdings waren die Laserherde in der Spironolactongruppe die nach 14 Tagen untersucht wurde signifikant kleiner als in der nach 3 Tagen untersuchten Gruppe

Für die Aldosteron- und Kontrollgruppe konnte dieser Unterschied nicht nachgewiesen werden.

Die Laserherde der verschiedenen Gruppen wiesen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede in Bezug auf ihre Fläche auf (Kruskal-Wallis-Test (KWT): 3dpl $p=0,455$, 14 dpl $p=0,209$). Dies bestätigt die durch das OCT angestoßene Hypothese, wonach das RAAS auf die Größe des Laserherdes keinen Einfluss hat. Allerdings ergaben sich zwischen den verschiedenen Zeiträumen hoch signifikante Unterschiede (Kruskal Wallis Test $p<0,001$) In der weiteren paarweisen Testung waren die Laserherde in den Spironolacton-(MWU $p=0,005$) und Kontrollgruppen (MWU $p=0,006$) nach 14 Tagen signifikant kleiner als nach 3 Tagen. In der Aldosterongruppe konnten diesbezüglich keine Signifikanzen nachgewiesen werden (MWU $p=0,476$).

Die genauen Ergebnisse der Laserherdgröße sind in Tabelle 6 aufgeführt. Eine graphische Darstellung ist in Abbildung 21 dargestellt.

Statistische Parameter	3 dpl			14 dpl		
	Aldo	Kontrolle	Spiro	Aldo	Kontrolle	Spiro
Mean	27628,25	29519,91	34530,54	26675,53	23489,96	24509,53
Median	24595,50	28372,50	26177,88	22231,88	19884,50	19653,50
Perzentile 25	19913,50	22644,25	22133,25	16612,50	16740,00	16102,00
Perzentile 75	36200,75	32792,50	41667,75	33557,50	29011,00	27301,50
Range	44275,25	62289,50	81427,25	60603,50	37197,00	52293,50
Standard Deviation	11714,91	11741,28	20292,09	13305,20	9506,20	13202,70
Total N	32	31	32	46	45	37

Tabelle 6 Laserherdgröße in μm im Infrarotbild der FAG (Aldo = Aldosteron, Spiro = Spironolacton)

3.2.2 Der Einfluss auf Leckage - Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI)

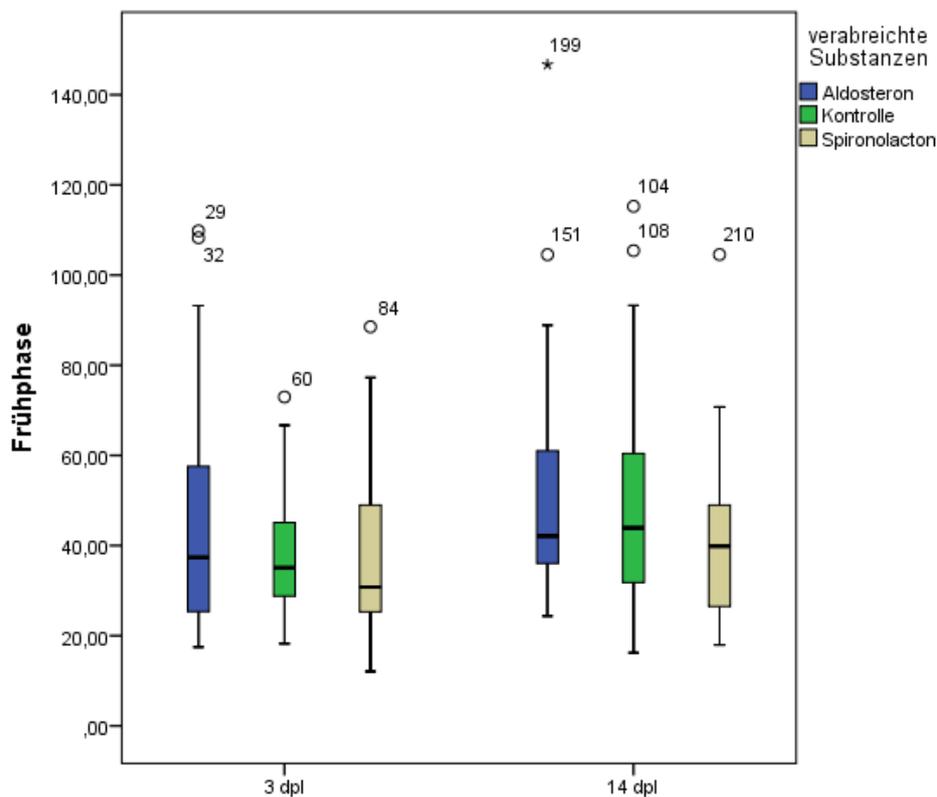


Abbildung 22 MFI in der Frühphase der FAG 3 und 14 dpl

In der Frühphase ist noch nicht die maximale Fluoreszenz der Angiographie erreicht. Hier zeigt sich eine tendenziell erhöhte Fluoreszenz in der Aldosterongruppe im Vergleich zu Kontrolle und Spironolactongruppe. Signifikante Unterschiede können jedoch nicht nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu Beobachtungen bei menschlichen intravenösen Fluoreszenzangiographie konnte nach intraperitonealer Injektion der Mäuse in der Spätphase (5-10 min nach Injektion) die höchste retinale und choroidale Fluoreszenzaktivität nachgewiesen werden. In der Frühphase war die MFI geringer als in der Spätphase.

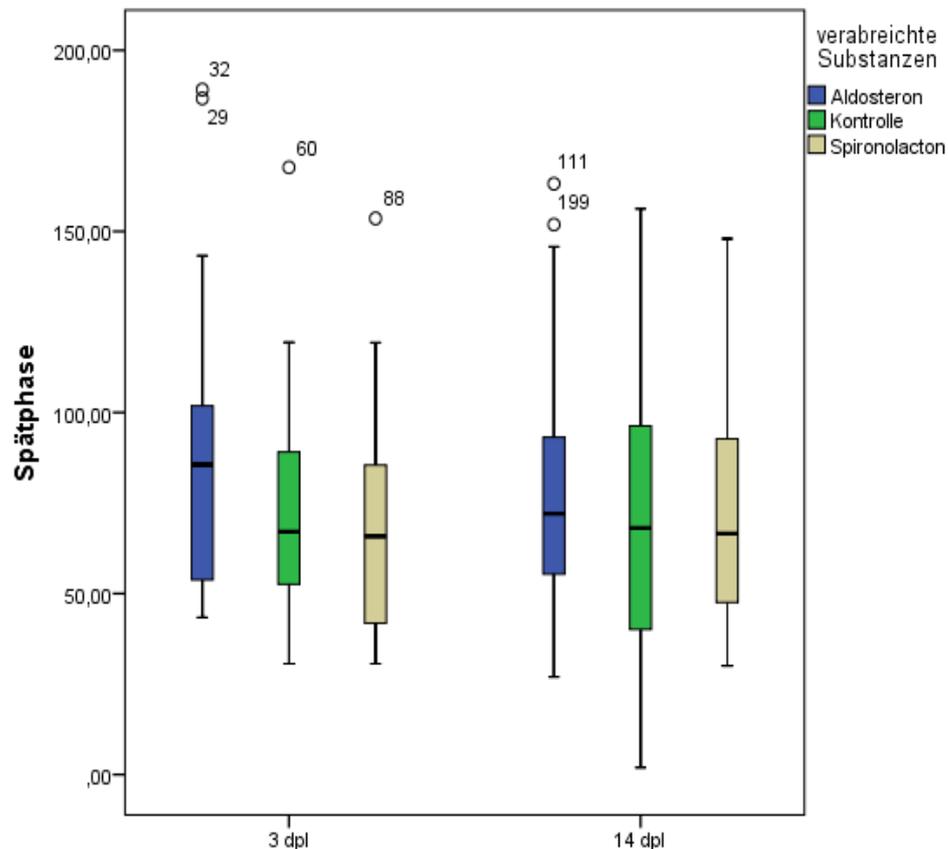


Abbildung 23 MFI in der Spätphase der FAG 3 und 14 dpl

Signifikante Unterschiede zwischen den Substanzgruppen konnten weder 3 noch 14 Tage nach Laserbehandlung festgestellt werden.

Bei der Gruppe nach drei Tagen untersucht wurde liegt der Median der Aldosterongruppe deutlich über dem Median der anderen Gruppen. Die erhöhte MFI war allerdings nicht signifikant.

Die Abbildung 22 und Abbildung 23 zeigen sowohl nach drei Tagen als auch nach vierzehn Tagen einen konsistenten Einfluss der Substanzen. Nach drei Tagen in der Früh- und Spätphase, sowie nach vierzehn Tagen in der Spätphase zeigte sich anhand des Medians die Tendenz einer Erhöhten Fluoreszenzaktivität in der Aldosterongruppe im Gegensatz zur Kontrolle und Spironolactongruppe.

Zu allen Zeitpunkten bewegt sich die Fluoreszenzaktivität der Spironolactongruppe minimal unter der Fluoreszenzaktivität der Kontrolle.

Diese Tendenz der Fluoreszenzintensität konnte jedoch zu keinem Versuchszeitpunkt, weder in der Früh- noch in der Spätphase des Versuches, als signifikanter Unterschied der Fluoreszenzintensität zwischen den Substanzgruppen nachgewiesen werden (Tabelle 7).

Phase	P-Wert Kruskal Wallis Test	Anzahl Laserherde (Aldo/Kontrolle/Spiro)	Median		
			Aldo	Kontrolle	Spiro
Frühphase 3dpl	0,468	32/31/32	37,37	35,07	30,70
Frühphase 14dpl	0,685	41/45/34	41,17	43,80	40,79
Spätphase 3dpl	0,113	32/31/31	85,60	67,11	65,81
Spätphase 14dpl	0,685	44/44/28	73,18	68,08	66,57

Tabelle 7 Kruskal-Wallis- und Man-Whitney-U Testergebnisse MFI (Aldo= Aldosteron, Spiro = Spironolacton)

3.2.3 Verhältnis MFI zu Pixelanzahl

Auch die Kombination der MFI und Pixelzahl zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Ein Einfluss auf Leakage der choroidalen Neovaskularisationen konnte nicht nachgewiesen werden. Die genauen Daten sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Früh- phase	3 dpl			14 dpl		
	Kontrolle	Aldo	Spiro	Kontrolle	Aldo	Spiro
Mean	1128692,20	1214123,57	1235438,01	1168008,92	1504003,16	1248864,71
Median	1109879,10	1080231,94	982488,64	905891,28	944547,20	755005,75
Total N	31	32	32	45	46	37
KW- Test	p=0,987			p=0,254		
Spät- phase	3 dpl			14 dpl		
	Kontrolle	Aldo	Spiro	Kontrolle	Aldo	Spiro
Mean	2229555,53	2476987,34	2232994,05	1984468,41	2389810,38	2159813,98
Median	2060857,04	2380145,26	1826630,28	1553150,72	1550170,80	1598829,06
Total N	31	32	32	45	46	37
KW- Test	p=0,316			p=0,624		

Tabelle 8 Verhältnis MFI zu Pixelzahl

3.3 Immunhistochemie

3.3.1 Angiogenese und Inflammation – Isolektin B4 und VEGF

3.3.1.1 Isolektin B4

Isolektin B4 (IB4) konnte sowohl drei als auch vierzehn Tage nach der Laserbehandlung im gesamten Laserherd (u.a. an Endothelzellen) binden. Auch in der inneren Körnerschicht ließen sich vereinzelte fluoreszierende Zellen beobachten (siehe Abbildung 24).

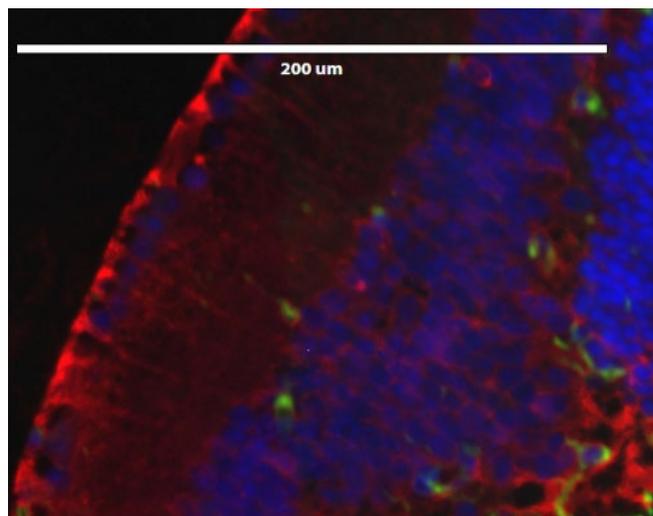


Abbildung 24 Ausschnitt aus der Retina (Ganglienzellschicht, innere Körnerschicht) mit einzelnen IB4 (grün) gefärbten Zellen

In den Laserherden konnten drei Tage post Laser keine reproduzierbaren Unterschiede zwischen den Antagonisten Aldosteron und Spironolacton sowie der Kontrolle nachgewiesen werden. Nach vierzehn Tagen zeigte sich eine reproduzierbar stärkere IB4-Färbung bei Tieren mit Aldosteronbehandlung als bei der Kontrollgruppe. Spironolactongabe führte zu einer kleineren und schwächeren Färbung mit IB4 (siehe Abbildung 25).

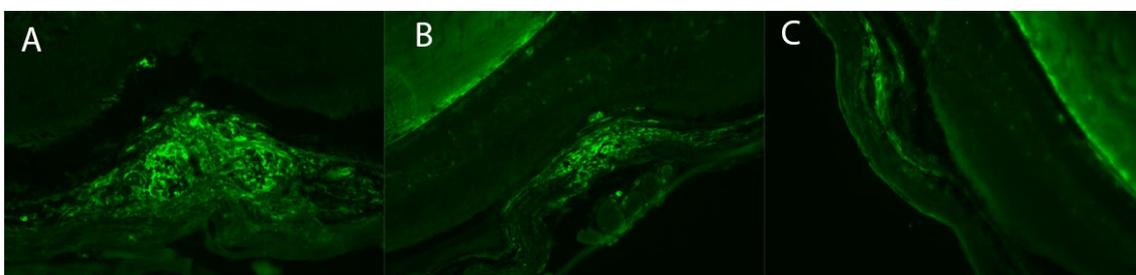


Abbildung 25 IB4-Färbung von CNV in Laserherden 14 dpl (A-Aldosteron, B-Kontrolle, C-Spironolacton), 40 fache Vergrößerung.

Verstärkte IB-4 Expression durch Aldosteron, verminderte IB-4 Expression durch Spironolacton)

3.3.1.2 VEGF

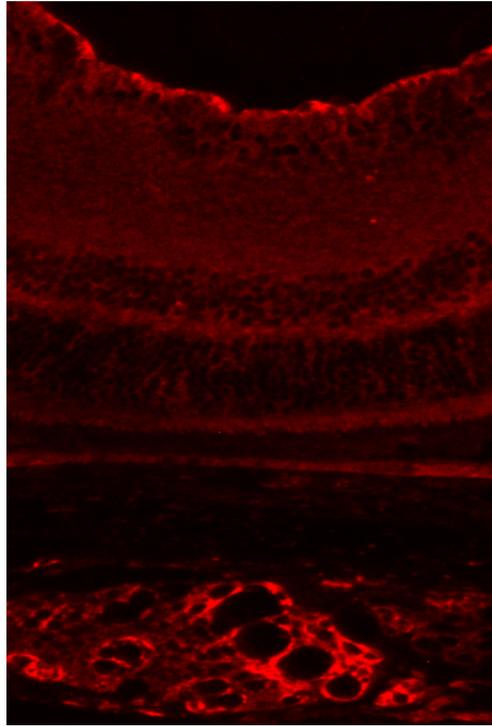


Abbildung 26 VEGF Expression in der Retina und unten im Bild der Choroidea, 20 fache Vergrößerung

Eine hohe Expression findet sich in der Choroidea, aufgrund der hohen Gefäßdichte. In der Retina wird VEGF besonders in der Ganglienzellschicht und im RPE exprimiert. Geringere Expression zeigte sich in der inneren und äußeren Körnerschicht sowie in der plexiformen Schicht.

VEGF wurde in der Retina besonders in der Ganglienzellschicht sowie im RPE exprimiert. In geringerer Menge konnte VEGF in der inneren und äußeren Körnerschicht und plexiformen Schicht nachgewiesen werden. Im Choroid findet sich ebenfalls eine hohe Expression. Die Expression in der unbehandelten Retina ist in Abbildung 26 abgebildet.

Deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen waren nach drei Tagen auffällig. Aldosteron erhöhte Fluoreszenzintensität der VEGF-Färbung innerhalb der Laserherde stark während sie durch Spironolacton im Vergleich zur Kontrolle etwas verringert wurde (siehe Abbildung 27).

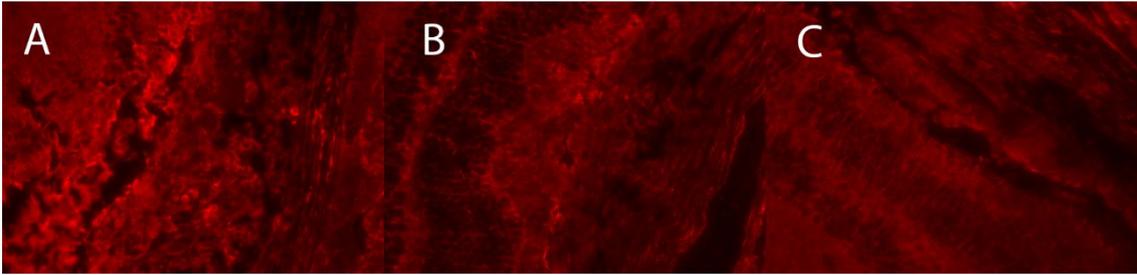


Abbildung 27 VEGF-Expression im Laserherd mit CNV 3dpl (A-Aldosteron, B-Kontrolle, C-Spironolacton), 40-fache Vergrößerung.

Aldosteron führt nach 3 Tagen zu einer erhöhten VEGF-Expression im Vergleich zur Kontrolle, während diese durch Spironolacton vermindert wird.

Vierzehn Tage nach Laserbehandlung zeigten alle drei Gruppen eine vergleichbare Expression von VEGF im Laserherd

3.3.2 Einfluss auf Tight- und Adherens Junctions

3.3.2.1 Claudin 5

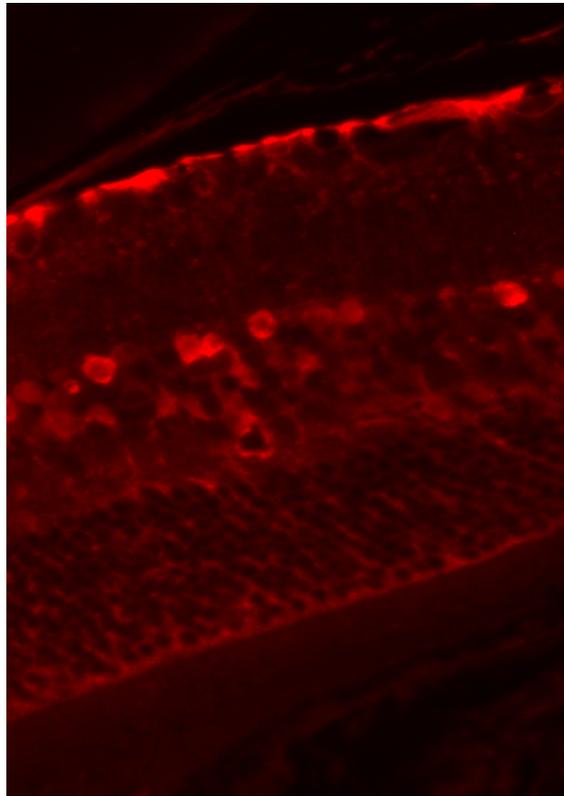


Abbildung 28 Claudin-5 Expression in der normalen Retina, 20fache Vergrößerung – vermehrte Expression in der Ganglienzellschicht, an Synapsen und Endothelzellen

Claudin 5 wurde in der Mäuseretina in der Ganglienzellschicht, der inneren und äußeren Körnerschicht, sowie der inneren und äußeren plexiformen (Synapsen-)Schicht und der äußeren Grenzmembran nachgewiesen (siehe Abbildung 28). Auch im Laserherd, bzw. in der Abgrenzung zwischen Laserherd und Retina kam es zur Claudin 5-Expression.

Nach drei Tagen Aldosterongabe zeigte sich vereinzelt eine verringerte Expression von Claudin 5, nach vierzehn Tagen war ein deutlicher, reproduzierbarer Rückgang von Claudin 5 unter Aldosterongabe im Gegensatz zu Spironolacton und Kontrolle sichtbar. Spironolactongabe konnte keine konsistenten Effekte im Vergleich zur Kontrolle erzielen.

Die Mikroskopfotographien Abbildung 29, Abbildung 30 sowie Abbildung 31 zeigen klar die verminderte Claudin-5-Expression unter Aldosteroneinfluss. In Abbildung 29 kann der Unterschied in der gesamten Retina nach 14 Tagen Behandlung nach Laser dargestellt werden.

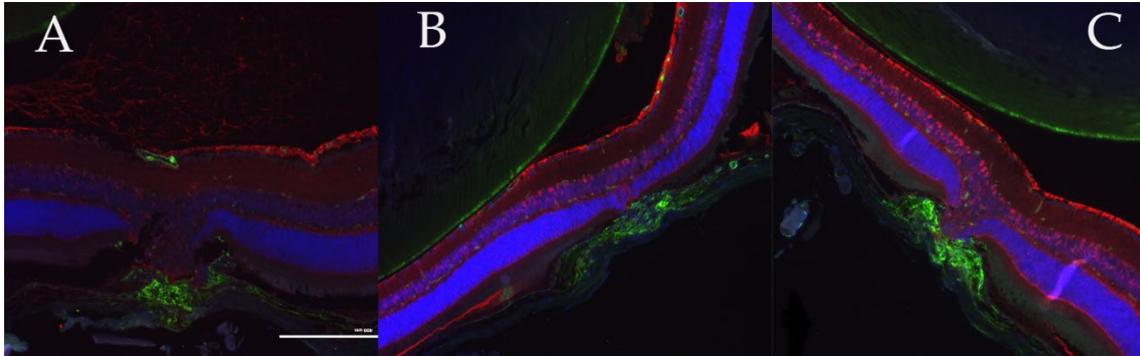


Abbildung 29 Claudin5 (gefärbt mit Texas Red – TR - rot) -Expression in der Retina 14 dpl (A-Aldosteron, B-Kontrolle, C-Spironolacton), 10fache Vergrößerung

Verminderte Claudin-5 Expression in der gesamten Retina nach 14 Tagen Aldosteroneinfluss

Abbildung 30 und Abbildung 31 präsentieren Vergrößerungen der CNV im Laserherd. Die Kontrolle ist immer im mittigen (B) Bild dargestellt, Aldosteron unter (A) links und Spironolacton unter (C) rechts. Sowohl in der Immunhistochemischen Färbung mit Texas Red

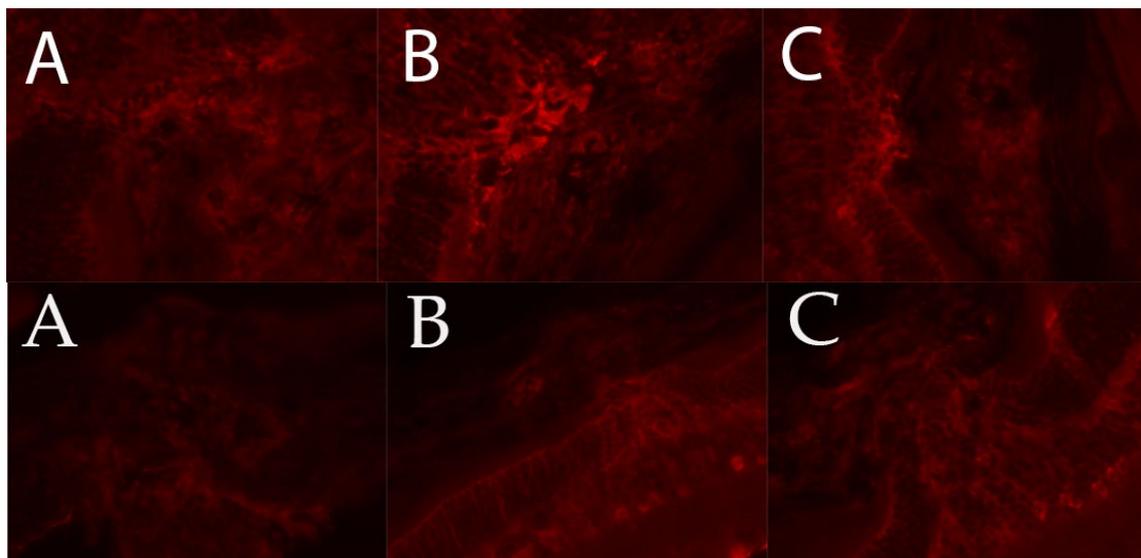
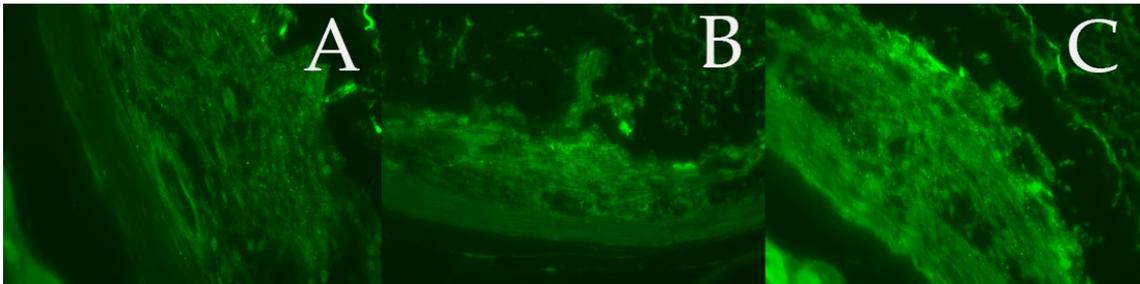


Abbildung 30 Claudin 5 (gefärbt mit Texas Red – TR - rot) A-Aldosteron, B-Kontrolle, C-Spironolacton) oben 3 dpl, unten 14 dpl, 40fache Vergrößerung

Claudin 5 wird vermehrt im Laserherd exprimiert, im Vergleich zum umliegenden Gewebe der gleichen Schichten. Nach drei Tagen Aldosteronbehandlung konnte vereinzelt eine verringerte Claudin 5 Expression nachgewiesen werden. Nach 14 Tagen wurde reproduzierbar und konsistent eine verringerte Claudin 5 Expression von den unabhängigen, verblindeten Bewertern in der gesamten Retina, sowie im Laserherd beschrieben.

in Abbildung 1 Abbildung 30, als auch mit Green Fluorescent Protein in Abbildung 31 ist die verminderte Expression und damit Fluoreszenzaktivität unter Einfluss von Aldosteron (A) im Vergleich mit Kontrollgruppe (B) deutlich sichtbar. Im Vergleich von Kontrolle (B) zur Spironolactongruppe (C) kann jedoch kein konsistenter und deutlicher Unterschied dargestellt werden.



*Abbildung 31 Claudin 5 (gefärbt mit Green Fluorescent Protein – GFP – grün) im Laserherd (A- Aldosteron, B-Kontrolle, C-Spironolacton) 14 dpl, 40 fache Vergrößerung
14 Tage nach Laserbehandlung zeigen die mit Aldosteron behandelten Laserherde eine reproduzierbar deutlich verminderte Expression von Claudin 5 im Vergleich zur Kontrolle und den mit Spironolacton behandelten Laserherden.*

3.3.2.2 ZO-1

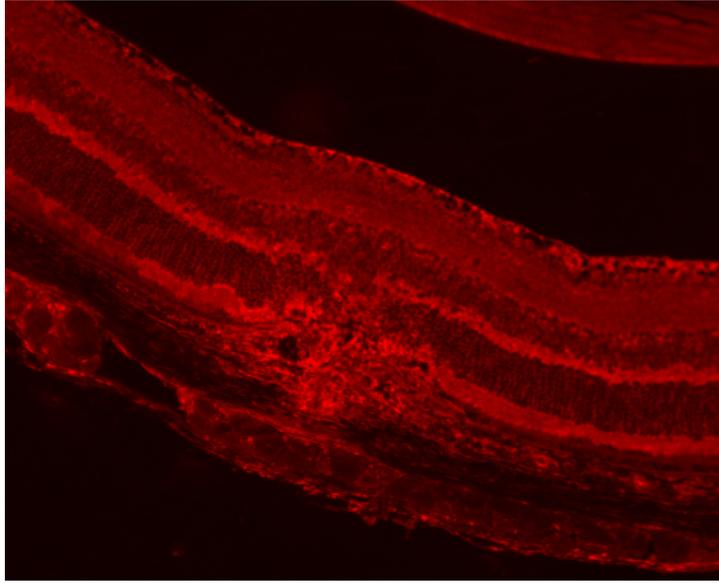


Abbildung 32 gefäßassoziierte ZO-1 Expression in LH und Retina, 20 fache Vergrößerung
ZO-1 zeigt eine gefäßassoziierte Expression in Retina und Choroidea. Stark ist die Ausprägung in Ganglienzellschicht/innere Grenzmembran, äußerer plexiformen Schicht und im Stratum neuroepitheliale.

ZO-1 wurde in der normalen Retina besonders gefäßassoziiert in Retina und Choroid, in der Ganglienzellschicht (bzw. der inneren Grenzmembran), der äußeren plexiformen Schicht, sowie dem Stratum neuroepitheliale mit Photorezeptoren und RPE exprimiert (siehe Abbildung 32).

Auch in der inneren und äußeren Körnerschicht wurde ZO-1 schwach exprimiert.

Zwischen der Fluoreszenzintensität der einzelnen Gruppen im Laserherd konnten zu keinem Zeitpunkt deutliche oder reproduzierbare Unterschiede nachgewiesen werden. Aldosteron und Spironolacton hatten keinen darstellbaren Effekt auf die ZO-1-Expression.

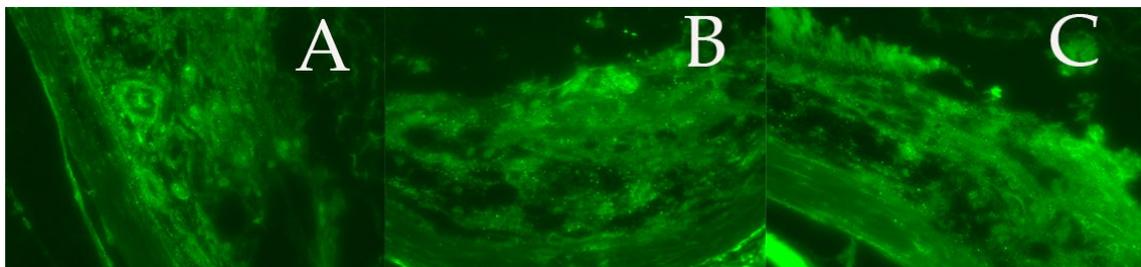


Abbildung 33
grün fluoreszierende Darstellung von ZO-1 in der CNV des Laserherdes (GFP) 14 dpl (A-Aldosteron, B-Kontrolle, C-Spironolacton). 40fache Vergrößerung
Ein Effekt durch Aldosteron- oder Spironolacton konnte nicht nachgewiesen werden.

3.3.2.3 VE-Cadherin

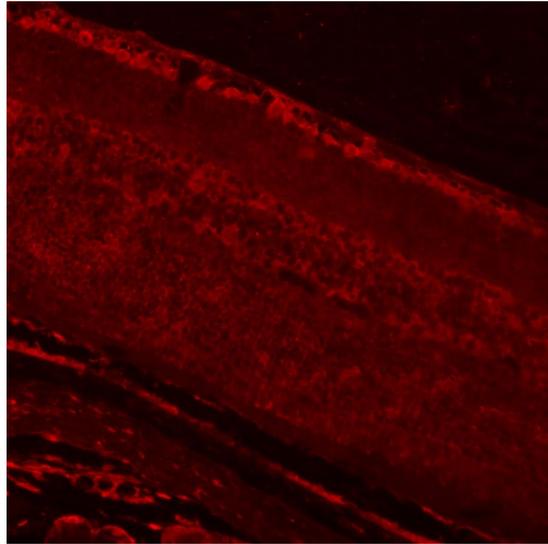


Abbildung 34 VE-Cadherin Expression in der Retina. 20fache Vergrößerung
Die Expression ist besonders gefäßassoziiert in Retina und Choroidea sichtbar.

VE-Cadherin wurde in der Mäuseretina gefäßassoziiert in Retina und Choroidea, in der Ganglienzellschicht, der inneren und äußeren Körnerschicht sowie im RPE nachgewiesen (siehe Abbildung 34). Auch im Laserherd wurde VE-Cadherin zell- und gefäßassoziiert exprimiert.

In den Laserherden der Tiere, die drei Tage lang mit den verschiedenen Substanzen behandelt wurden, konnten keine reproduzierbaren Unterschiede dargestellt werden. Im Rahmen der vierzehntägigen Behandlung mit Aldosteron zeigte sich die VE-Cadherin-Expression im Laserherd weniger prominent als in der Kontrollgruppe und der Spironolactongruppe (siehe Abbildung 35).

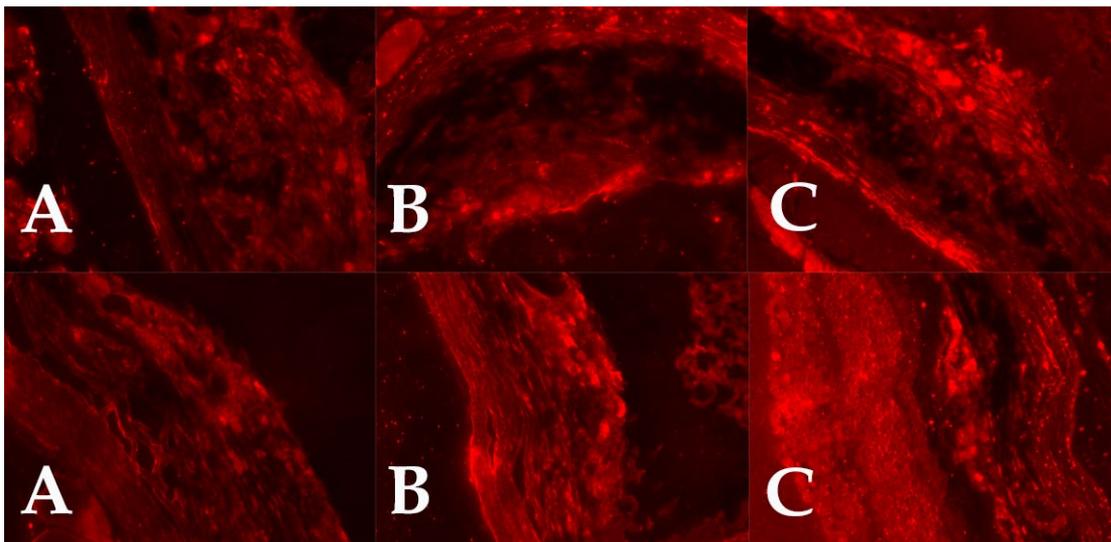


Abbildung 35 VE-Cadherin im LH (TR) 14 dpl (A-Aldosteron, B-Kontrolle, C-Spironolacton). 40fache Vergrößerung. VE Cadherin wird gefäßassoziiert, insbesondere im Bereich der CNV exprimiert. Am ausgeprägtesten ist die Expression nach Spironolactoneinfluss, am geringsten in der Aldosterongruppe.

3.3.3 Einfluss auf den Stoffaustausch (Vimentin, AQP-4, GLUT-1)

3.3.3.1 Vimentin

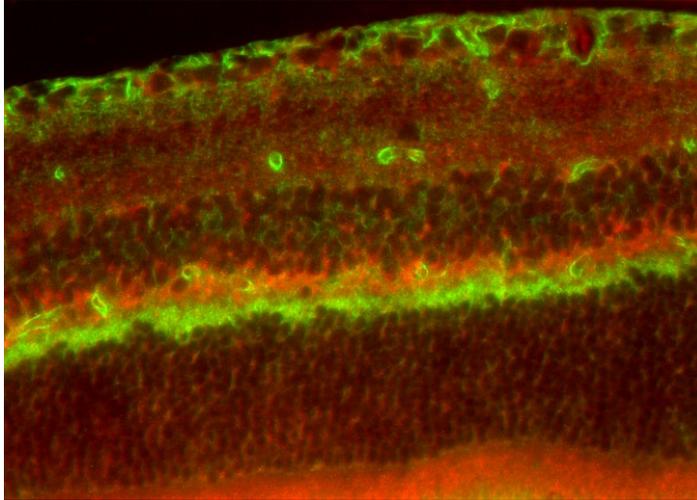


Abbildung 36 Vimentin (TR - rot) und AQP 4 (GFP-grün) in der Retina. Simultane Expression in den Müllerzellen. 40fache Vergrößerung

Alleinige Vimentinexpression kennzeichnet mesenchymale Zellen. Diese konnten auch im Laserherd nachgewiesen werden.

Vimentin konnte in der Retina in der Ganglienzellschicht, der äußeren plexiformen Schicht, teilweise assoziiert zum RPE und im Laserherd nachgewiesen werden. Außerdem zeigten sich schwach gefärbte horizontale Ausläufer von der inneren bis zur äußeren Grenzmembran.

Abbildung 36 zeigt die Verteilung der Expression in der normalen Retina.

Simultane Expression von Aquaporin-4 und Vimentin dient zur Identifikation von Müller-Zellen (siehe Abbildung 36). Alleinige Vimentinexpression kennzeichnet mesenchymale Zellen.

Nach drei Tagen Aldosteronbehandlung konnte eine leicht verstärkte, in der Kontrollgruppe eine mittlere und nach Spironolactonbehandlung eine reduzierte Vimentinexpression im Laserherd dargestellt werden (siehe Abbildung 37).

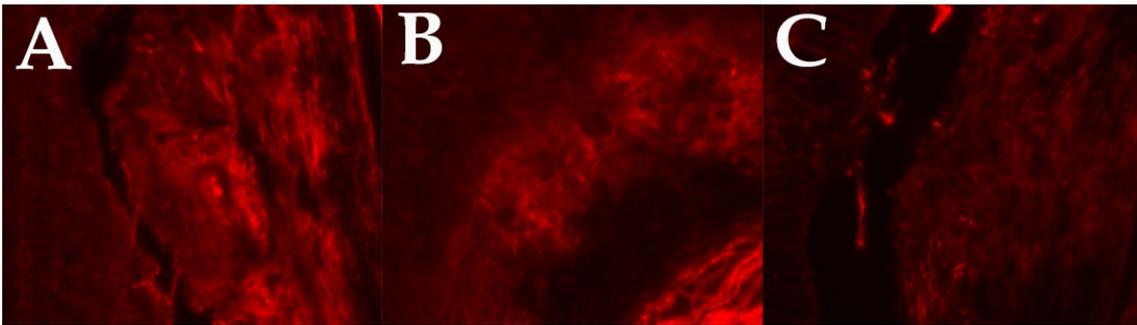


Abbildung 37

Vimentinexpression im Bereich der CNV Laserherd (TR) 3 dpl (A- Aldosteron, B- Kontrolle, C- Spironolacton), 40 fache Vergrößerung - Verstärkte Expression unter Aldosteroneinfluss (A), vermindert unter Spironolactongabe (C) im Vergleich zur Kontrolle

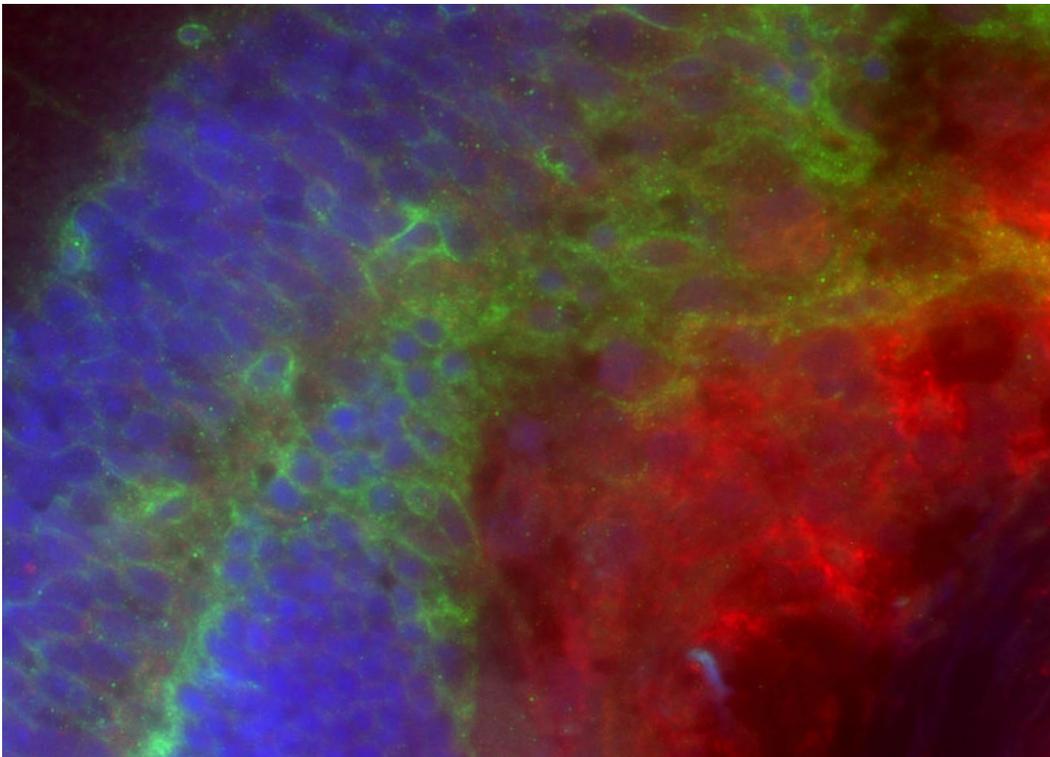


Abbildung 38

Cofärbung Vimentin (Rot) und AQP 4 (grün) im Laserherd 3dpl, Kontrollgruppe, 60fache Vergrößerung. Vimentin ist hauptsächlich im Laserherd im Bereich der CNV exprimiert. Dort zeigt sich keine, bzw. zum Teil schwache Co-Färbung mit Aquaporin. Es handelt sich zu einem Großteil um mesenchymale Zellen.

Aquaporin wird eher darüber im Übergang zur Retina exprimiert.

Die Vimentinfärbung ist besonders im Laserherd in der Region der CNV nach 3 dpl stark ausgeprägt. Auffällig ist, dass in allen Gruppen die Cofärbung mit Aquaporin dort sehr viel schwächer ist. Aquaporin wird hauptsächlich über der CNV exprimiert. Die für die Müller-Zellen typische Co-Färbung von Aquaporin und Vimentin ist hier nicht sichtbar (Abbildung 38).

3.3.3.2 Aquaporin 4

Aquaporin 4 (AQP 4) wurde in der Retina besonders in der äußeren plexiformen Schicht, sowie in der Ganglienzellschicht, der neuroretinalen Schicht und der äußeren Körnerschicht exprimiert. Besonders hervorzuheben ist die vertikale Distribution von der inneren zur äußeren Grenzmembran entlang des Verlaufs der Müllerzellen. An dieser Stelle weisen Vimentin und AQP 4 ein vergleichbares Expressionsmuster auf (siehe Abbildung 39).

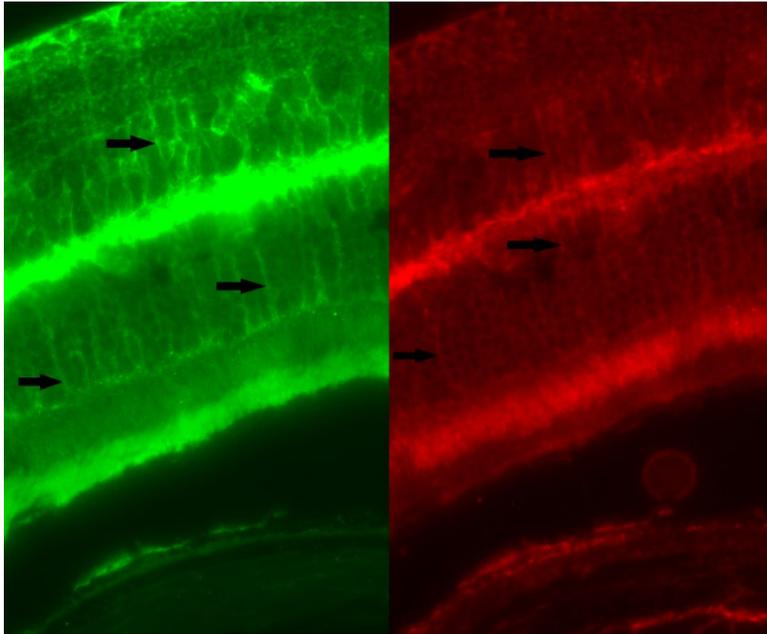


Abbildung 39 Links AQP 4 (GFP), rechts Vimentin (TR) unbehandelt, Foto des gleichen Abschnittes ohne LH, 20fache Vergrößerung, Pfeile weisen auf vertikale Ausläufer der Müllerzellen

In Bezug auf den Laserherd befanden sich viele AQP-4 positive Zellen unmittelbar über der CNV des Laserherdes und nur vereinzelt in der CNV. Reproduzierbare, deutliche Unterschiede bezüglich der Expression zwischen Aldosteron-, Kontroll- und Spironolactongruppe konnten nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 40).

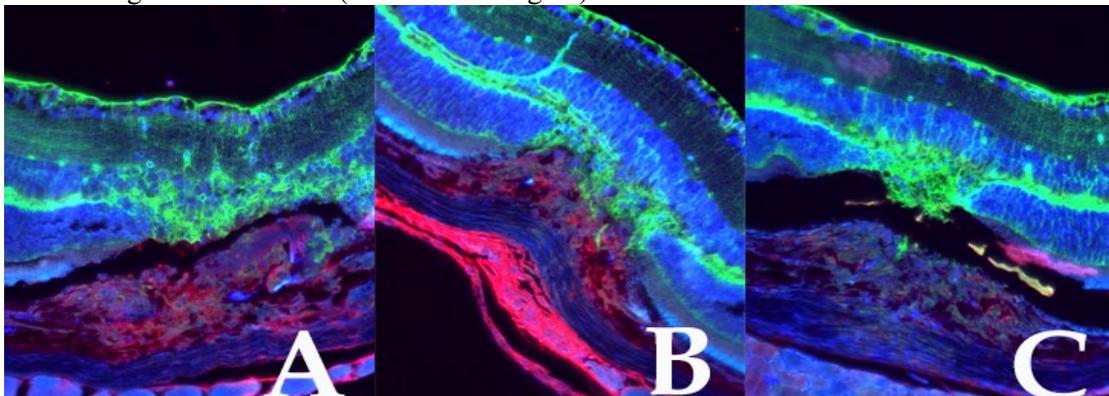


Abbildung 40 AQP 4 (GRP-grün) und Vimentin (TR-rot) 3dpl (A-Aldosteron, B-Kontrolle, C-Spironolacton) 20fache Vergrößerung – ein deutlicher Unterschied der AQP-4 Expression konnte nicht gesehen werden.

3.3.3.3 GLUT-1

Der Glucosetransporter 1 wurde in der Mäuseretina vor allem vom RPE exprimiert. In geringerer Ausprägung konnte GLUT-1 in der Ganglienzellschicht, der äußeren plexiformen Schicht und der äußeren Körnerschicht angefärbt werden (siehe Abbildung 41).

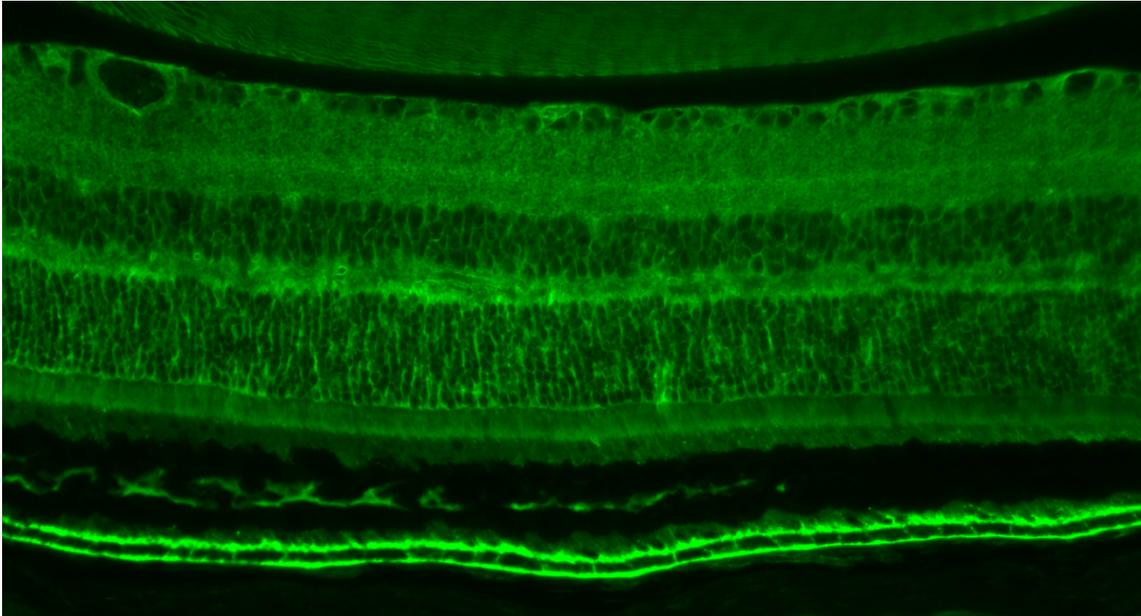


Abbildung 41 GLUT-1 (GFP) in der normalen Retina, 20fache Vergrößerung. Hauptsächlichste Expressionsorte sind die Ganglienzellschicht, die äußere plexiforme Schicht und äußere Körnerschicht.

Zwischen den Substanzgruppen ergaben sich keine deutlichen Unterschiede im Laserherd oder der Retina. Ein reproduzierbarer Effekt von Aldosteron und Spironolacton auf die GLUT-1 Verteilung konnte zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden (siehe Abbildung 42).

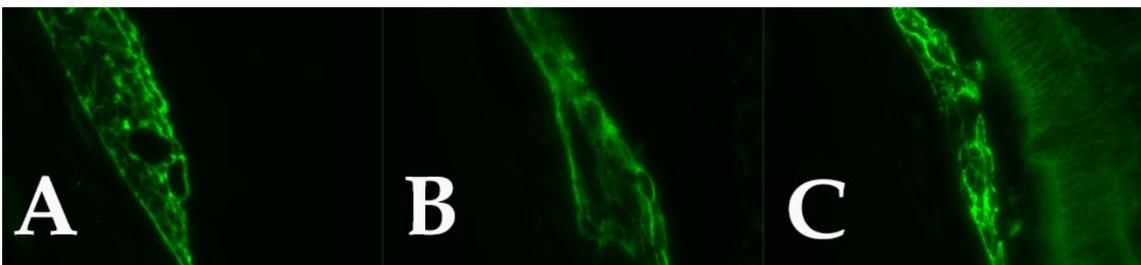


Abbildung 42 GLUT (GFP) 14 dpl (A-Aldosteron, B-Kontrolle, C- Spironolacton) 40fache Vergrößerung – die Expression zeigte keine Veränderung durch Aldosteron oder Spironolacton.

3.4 Humane Retinaendothelzellen

3.4.1 Einfluss von DMSO auf das Experiment

Zu allen Zeitpunkten konnte ein Einfluss des zur Substanzlösung verwendeten DMSO auf die Zellproliferation ausgeschlossen werden. In keinem der durchgeführten Versuche zeigte sich eine Suppression der Zellzahl oder der durchgeführten Proliferationszyklen der DMSO-Substituierten Zellen im Gegensatz zur Kontrollzellpopulation (siehe Tabelle 9).

Zeitpunkt	Gesamtzellzahl	Vitale Zellen	Avitale Zellen
24h	p=0,13	p= 0,153	P=0,312
48h	p=0,076 p=0,792	p=0,091 p=0,875	p=0,153 p=0,975
72h			

Tabelle 9 Kruskal-Wallis-Test: DMSO zu Kontrolle

3.4.2 Wirkung von Aldosteron und Spironolacton auf Proliferation und Vitalität der Endothelzellen

3.4.2.1 Gesamte Zellzahl

Die nicht parametrische Analyse der gesamten Zellzahlen ergab zu keinem Versuchszeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Die asymptotische Signifikanz im Kruskal Wallis Test erreichte zu keinem Zeitpunkt das Signifikanzniveau von 0,05 (24 h p=0,109, 48 h p=0,054, 72h p=0,072).

3.4.2.2 Lebende Zellen

Weder Aldosteron noch Spironolacton beeinflussten in den ersten 48 Stunden die Anzahl der überlebenden Zellen. Weder nach 24 Stunden noch nach 48 Stunden konnte ein signifikanter Effekt auf die Anzahl der CFSE-gefärbten Zellen nachgewiesen werden (KWT 24 h p=0,154, 48 h p= 0,062).

Nach 72 Stunden Inkubation mit den o.g. Substanzen konnten statistisch nachweisbare Unterschiede in der Anzahl der vitalen Zellen verzeichnet werden (KWT 72 h *p=0,018). Die zugegebenen Substanzen erreichen ihre vollständige Wirkung auf die Endothelzellen somit erst nach einigen Tagen Inkubationszeit. Die weitere nicht parametrische Testung ergab paradoxerweise sowohl für die niedrigste Aldosteronkonzentration von 100pM (MWU

**p=0,002) sowie für eine hohe Spironolactonkonzentration von 2 μ M (MWU **p=0,002) eine signifikante Zellzahlerhöhung der vitalen hRECs. Die antizipierte antagonistische Wirkung der beiden Substanzen ist nicht eingetreten, stattdessen beeinflussten sie die Zellen in die gleiche Richtung. Die Anzahl der vitalen Zellen nach 72 h wird in Abbildung 43 dargestellt.

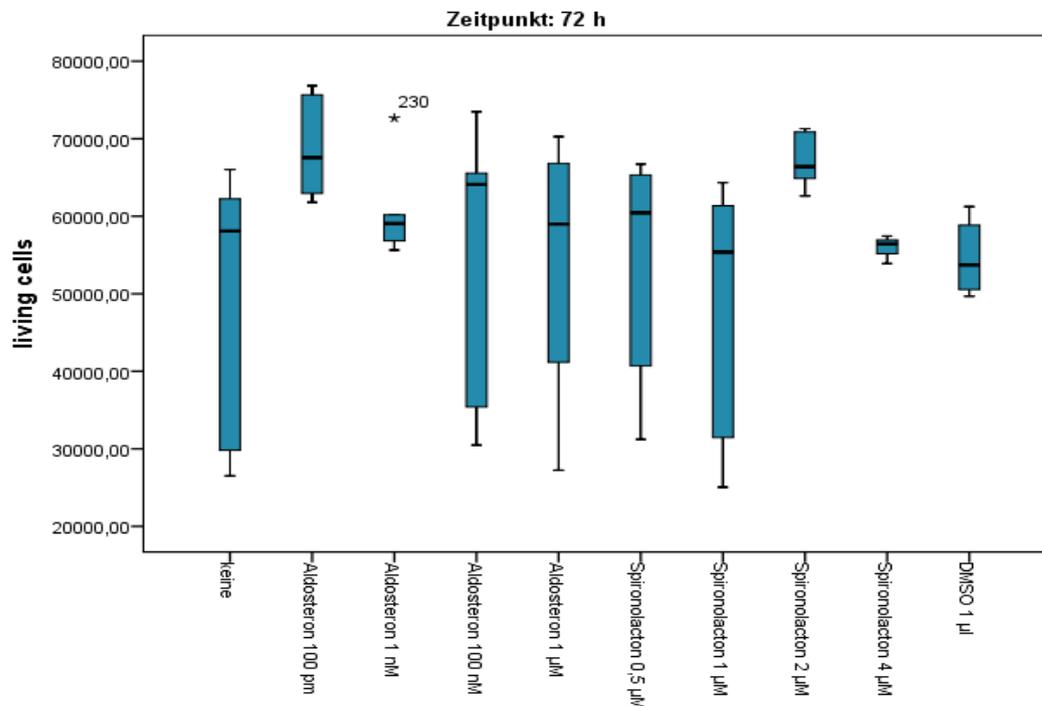


Abbildung 43 Vitale Zellen nach 72 h

Die Anzahl der vitalen Zellen nach 72 Stunden wurde durch eine Aldosteronkonzentration von 100 pM sowie Spironolactonkonzentration von 2 mM signifikant erhöht. Die antizipierte antagonistische Wirkung der Stoffe konnte nicht nachgewiesen werden.

Dieser proliferative Effekt konnte allerdings in keiner der anderen Aldosteron- oder Spironolactonkonzentrationen bestätigt werden. Möglicherweise entfalten die Substanzen ihre maximale Wirkung in diesen Konzentrationen. Allerdings muss trotz p-Wert unterhalb des Signifikanzniveaus eine zufällige Erhöhung als Alternativerklärung in Betracht gezogen werden, da es sich um eine explorative Analyse mit multiplen Testungen handelt.

3.4.2.3 Tote Zellen

Die durch Hoechst 33528 angefärbten abgestorbenen Zellen wiesen zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Substanzzugabe signifikant verschiedene Werte auf (KWT *p=0,036). Zu den übrigen Zeitpunkten konnten keine Abweichungen nachgewiesen werden (KWT 24 h p=0,891, 72 h p=0,501).

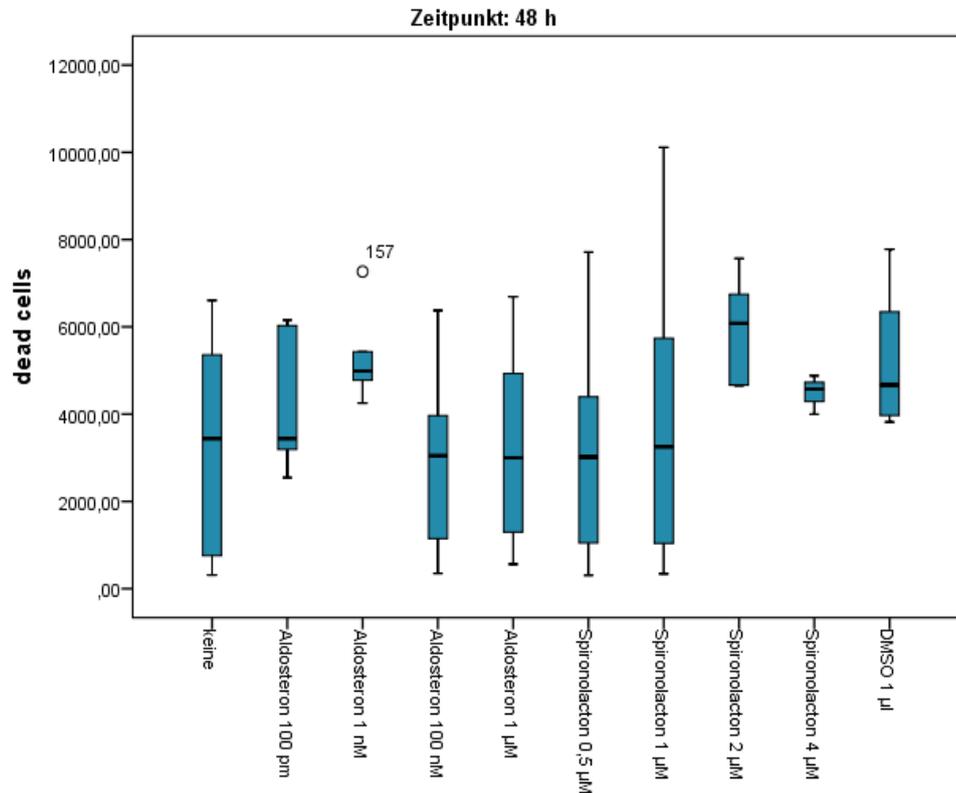


Abbildung 44 Tote Zellen nach 48 h

Nach 48 h war die Anzahl der toten Zellen bei der Aldosteronkonzentration von 100 nM sowie 1 µM verringert. Das Aldosteron wirkte also protektiv auf die Endothelzellen. Die Anzahl der toten Zellen bei Behandlung mit 2 µM Spironolacton war dagegen signifikant erhöht. Für die übrigen Konzentrationen ließ sich dieser antagonistische Effekt nicht signifikant zeigen.

In den detaillierten paarweisen Testungen zeigte sich wie bei den lebendigen Zellen einzelne Konzentrationen der beiden Substanzen mit signifikanten Unterschieden, welche in den anderen Bereichen der Titration nicht nachweisbar waren. Zellen die mit Aldosteron in der Konzentration 100 nM inkubiert wurden wiesen eine kleinere Population abgestorbener Zellen auf als die Kontrolle (MWU * $p=0,024$). Eine ähnliche Tendenz hatte die nächsthöhere und maximale Aldosteronkonzentration (MWU $p=0,053$). Ein antagonistischer Effekt konnte bei Zellen der Spironolacton 2 µM Gruppe beobachtet werden (MWU * $p=0,0032$). Die Anzahl der toten Zellen nach 48 Stunden wird in Abbildung 44 dargestellt.

Diese Ergebnisse lassen auf eine gegensätzliche Wirkung der beiden Wirkstoffe schließen, wobei Spironolacton in diesem Fall einen negativen Effekt auf die Endothelzellen hatte wohingegen Aldosteron eine protektive Wirkung auf die Vitalität der Zellen zeigte.

3.4.2.4 Proliferationszyklen

Konsistent mit den Ergebnissen der Gesamtzellzahlen konnte auch durch die Auswertung der MFI der CFSE-Färbung keine signifikanten Veränderungen der Proliferation nachweisen.

Innerhalb von 48 Stunden konnte weder eine Behandlung der Zellen mit Aldosteron noch mit Spironolacton eine Hemmung oder Beschleunigung der Proliferation erreichen. (KWT $p=0,421$). Die Proliferationszyklen sind in Abbildung 45 dargestellt.

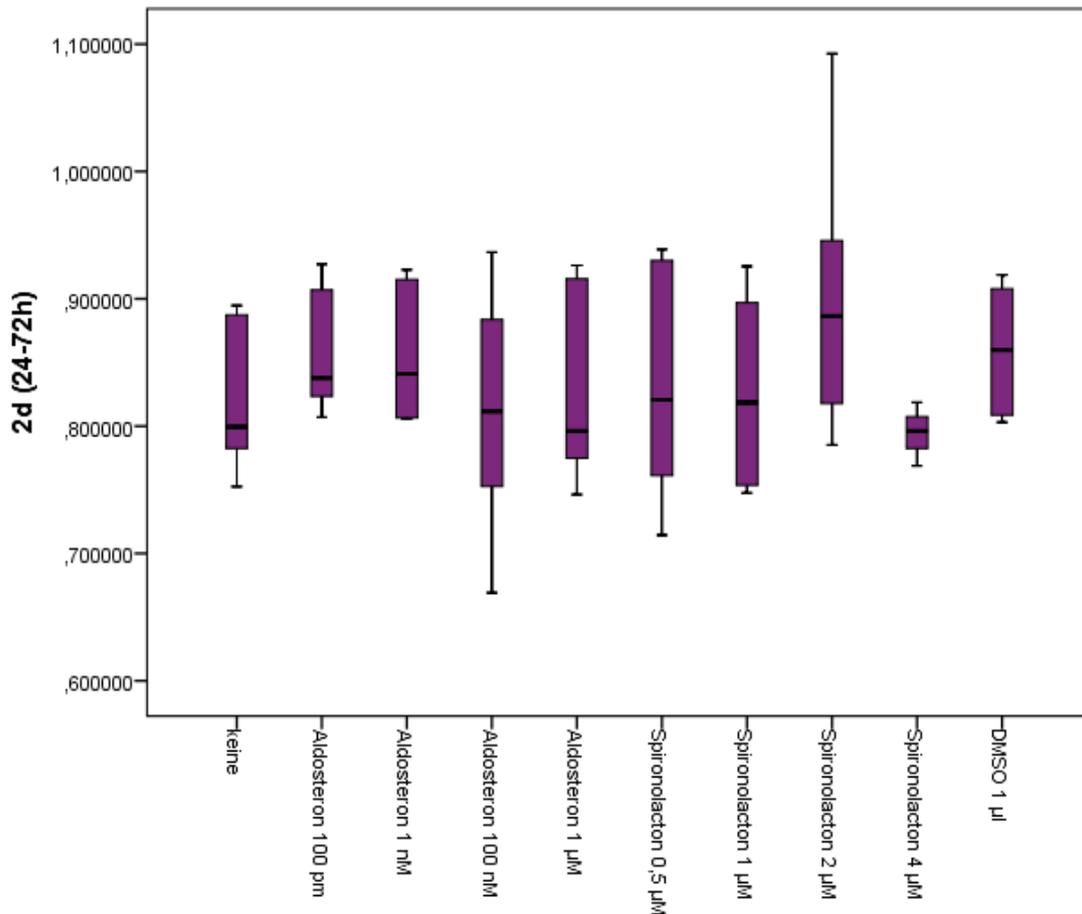


Abbildung 45 Proliferationszyklen über 48 Stunden (Zeitpunkt 24 h bis 72 h)

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Es zeigte sich also in dieser Untersuchung kein Einfluss der Substanzen auf die Proliferation unter normalen kulturellen Bedingungen.

3.4.3 H2O2 – oxidativer Stress

3.4.3.1 Antiproliferative Wirkung des oxidativen Stresses

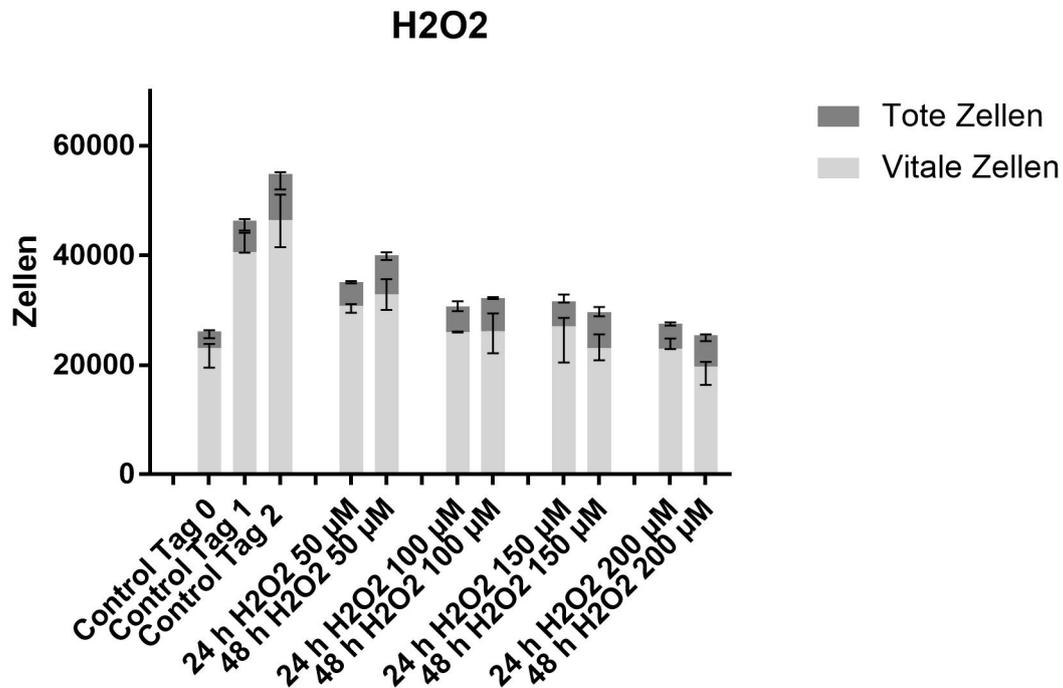


Abbildung 46 Titration - Oxidativer Stress durch Wasserstoffperoxid

Der oxidative Stress durch das hinzugefügte Wasserstoffperoxid führte in jeder Konzentration und proportional zur Konzentration zu einer signifikanten Verminderung der Proliferation und damit der vitalen Zellen sowie zu einer signifikanten Reduzierung der Gesamtzellzahl.

Eine Zunahme der avitalen Zellen zeigte sich hingegen nicht. Es wurde also die Proliferation gehemmt.

Das Verhalten unter der Einwirkung von oxidativem Stress wurde mithilfe der Zugabe von H_2O_2 untersucht. Durch eine Titration konnte die proportional zur Konzentration auftretende signifikante Proliferationshemmung der hRECs dargestellt werden (für ausführliche Daten siehe Tabelle 10 sowie die graphische Darstellung in Abbildung 46). Im Mann-Whitney U Test zeigte jede verwendete Konzentration des zugegebenen Wasserstoffperoxids eine stark signifikante Reduzierung der Gesamtzellzahl, welche sich ebenfalls in der Anzahl der vitalen Zellen widerspiegelte (siehe Tabelle 11).

Konzentration	Gesamtzellzahl									
	24 h					48 h				
	H ₂ O ₂	N	Mean	Perc. 25	Median	Perc. 75	N	Mean	Perc. 25	Median
kein	9	53086,6	48149,8	52754,4	57576	18	59832,6	49048,8	57097,4	71670,0
50 µM	3	34865,5	33689,6	35408,8	35498	6	38860,4	37948,5	38616,6	40385,4
100 µM	3	30839,85	29944,89	30948,5	31626,1	6	31719,9	28624,4	32429,2	34044,6
150 µM	3	30371,5	26385,3	31639,6	33089,8	6	29413,9	26328,6	30077,0	31211,8
200 µM	3	28230,3	27288,4	27605,9	29796,7	6	24396,2	22377,0	24600,2	25924,9

Tabelle 10 Gesamtzellzahlen bei verschiedenen Wasserstoffperoxidkonzentrationen

H ₂ O ₂	24 h		48h	
	Lebende Zellen	Zellen Gesamt	Lebende Zellen	Zellen Gesamt
50 µM	P=0,009	P=0,009	P<0,001	P<0,001
100 µM	P=0,009	P=0,009	P<0,001	P<0,001
150 µM	P=0,009	P=0,009	P<0,001	P<0,001
200 µM	P=0,009	P=0,009	P<0,001	P<0,001
KWT	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001

Tabelle 11 Ergebnisse des Kruskal-Wallis und Man-Whitney U Testes

Die Menge der toten, mit Hoechst 33258 gefärbten Zellen blieb davon unbeeinflusst. Im Kruskal Wallis Test konnten weder nach 24 noch nach 48 Stunden zahlenmäßige Unterschiede der toten Zellpopulation zwischen der Kontrolle und den mit Wasserstoffperoxid inkubierten Zellen nachgewiesen werden (KWT 24 h p=0,219, 48 h p=0,13).

Somit wird auf die Zellen in diesem Modell oxidativer Stress mit negativem Einfluss auf die Teilungsfähigkeiten der Zellen ausgeübt, ohne dass das Überleben der Zellen beeinflusst wird.

3.4.3.2 Zellpopulationen

Ein Einfluss von Aldosteron und Spironolacton auf Zellen unter oxidativem Stress konnte in den Versuchen teilweise nachgewiesen werden. Es ergaben sich in der gruppenübergreifenden Testung mittels Kruskal Wallis Test zu beiden Zeitpunkten signifikante Unterschiede sowohl in der gesamten Zellzahl (KWT 24 h p=0,004, 48h p<0,001) als auch in der Anzahl der lebenden Zellen (KWT 24 h p=0,003, 48 h p<0,001). Die Gesamtzellzahlen sind nach Zeitpunkten in Abbildung 47 und Abbildung 48 dargestellt. In der weiteren Einzeltestung konnte eine

antagonistische Wirkung von Aldosteron und Spironolacton nachgewiesen werden. Aldosteron 100 pM förderte signifikant nach 48 Stunden die Proliferation der mit 100 µg H₂O₂ behandelten Zellen. Die Gesamtzellzahl war im Gegensatz zu den als Kontrolle mit H₂O₂ 100 µg inkubierten Zellen zwar erhöht, der Effekt war jedoch nicht signifikant. Die Wirkung höherer H₂O₂ Konzentrationen konnte allerdings nicht mehr ausgeglichen werden. Bei Inkubation der Zellen mit 150 µg H₂O₂ auf 20.000 Zellen waren die Gesamtzellzahlen nicht erhöht (MWU-Test 48h p=0,262).

Allerdings lassen sich diese erhöhten Zellzahlen nicht eindeutig den vitalen oder avitalen Populationen zuordnen. Hier finden sich keine signifikanten Erhöhungen. Die überzähligen Zellen lassen sich also zu ähnlichen Teilen in der jeweiligen Subgruppe finden. Ein Überlebensvorteil der zusätzlichen Zellen konnte also nicht beobachtet werden.

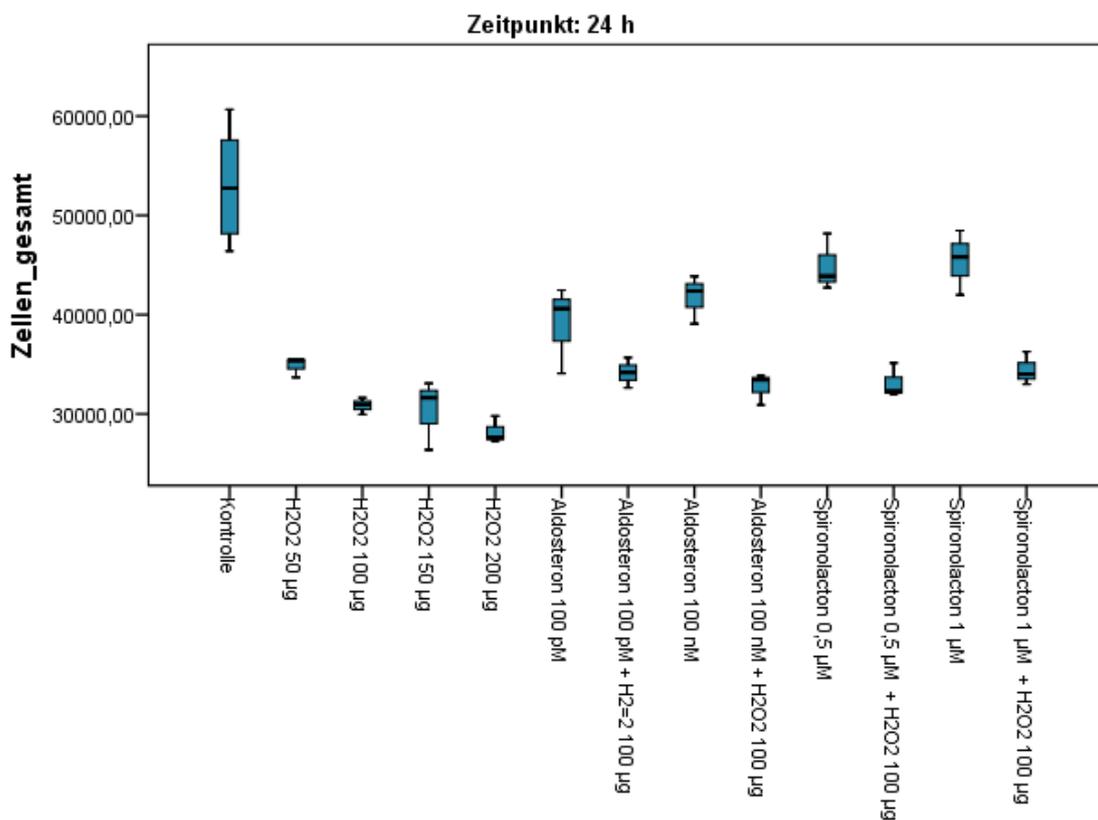


Abbildung 47 Gesamtzellzahl nach 24 h

Wasserstoffperoxid vermindert die Gesamtzellzahl durch Proliferationshemmung auch bei gleichzeitiger Zugabe der Substanzen Aldosteron und Spironolacton im Vergleich zur Gesamtzellzahl ohne Wasserstoffperoxid mit gleicher Substanzzugabe.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Substanzgruppen konnte nach 24 h nicht nachgewiesen werden.

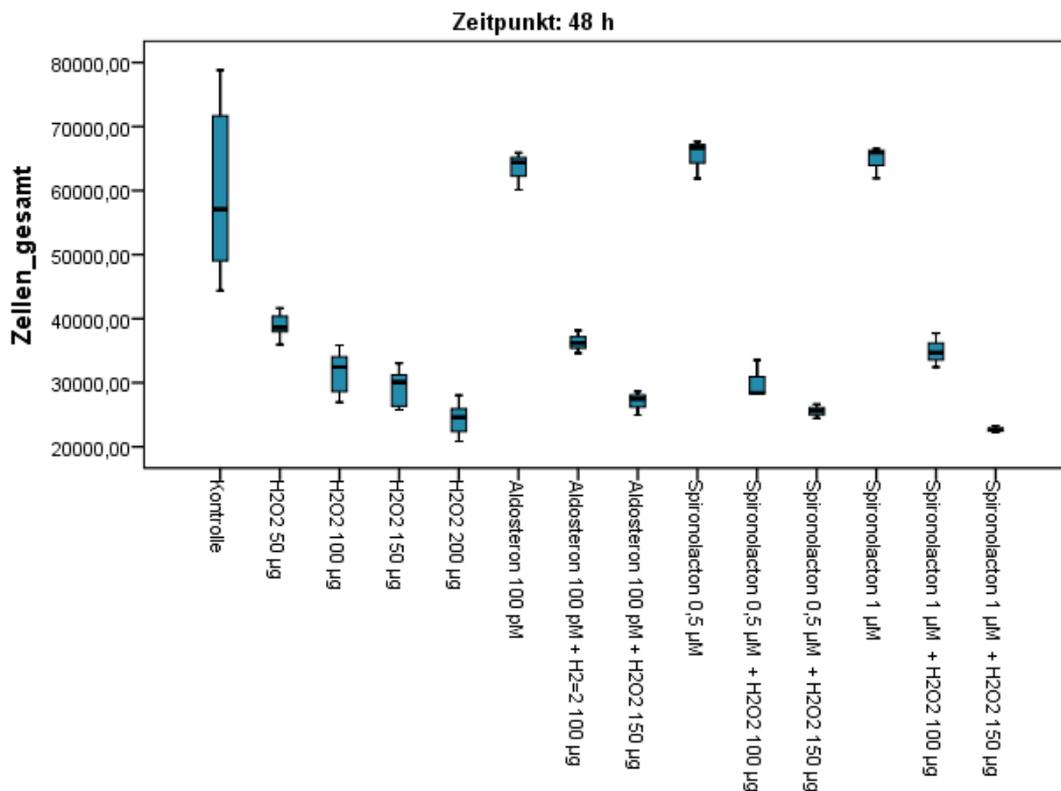


Abbildung 48 Einfluss auf die Gesamtzellzahl nach 48 h unter oxidativem Stress

Signifikant verringert war die Gesamtzellzahl sowie die Zahl der vitalen Zellen von Spironolacton 1 µM mit 150 µg Wasserstoffperoxid im Vergleich zur Kontrolle mit 150 µg Wasserstoffperoxid. Für die geringere Spironolactonkonzentration zeigte sich nur eine signifikante Reduktion der vitalen Zellen.

Für Aldosteronkonzentrationen konnte nur eine vereinzelte signifikante Veränderung dargestellt werden. Bei 100 µg Wasserstoffperoxidzusatz hatten 100 nM Aldosteron einen proliferativen Effekt.

Es konnte also zum Teil ein signifikanter, antagonistischer Effekt nachgewiesen werden, der sich aber nicht in allen Konzentrationsverhältnissen reproduzieren ließ.

Für die Spironolactonkonzentration von 1 µM konnte nach 48 h eine verringerte Gesamtzellpopulation der mit 150 µg H₂O₂ behandelten Zellen (MWU-Test p=0,024) nachgewiesen werden. Für die lebenden, CFSE-gefärbten Zellen dieser Spironolactonkonzentration konnte ebenfalls eine signifikante Verringerung der Zellmenge nach 48 h nachgewiesen werden, die tote Zellpopulation blieb im Vergleich zur H₂O₂-Kontrolle unbeeinflusst. Es zeigte sich hier ein antiproliferativer Effekt.

Dies wird erhärtet durch die ebenfalls zur H₂O₂ Kontrolle signifikant verringerte Population der vitalen Zellen in den mit Spironolacton 0,5 µM oder 1 µM behandelten und 150 µg H₂O₂

inkubierten Zellen. Die Auswertung mittels MWU-Tests ist in Tabelle 12 und Abbildung 49 dargestellt.

Konzentration	Gesamte Zellzahl		Vitale Zellen	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Aldosteron 100 pM + H ₂ O ₂ 100 µg	P= 0,1	P=0,048	P= 0,1	P= 0,262
Aldosteron 100 pM + H ₂ O ₂ 150 µg	-	P= 0,262	-	P= 0,262
Aldosteron 100 nM + H ₂ O ₂ 100 µg	P= 0,4	-	P= 0,7	-
Spirolacton 0,5 µM + H ₂ O ₂ 100 µg	P= 0,1	P= 0,548	P= 0,1	P= 0,548
Spirolacton 0,5 µM + H ₂ O ₂ 150 µg	-	P= 0,095	-	P= 0,048
Spirolacton 1 µM + H ₂ O ₂ 100 µg	P= 0,1	P= 0,262	P= 0,1	P= 0,167
Spirolacton 1 µM + H ₂ O ₂ 150 µg	-	P= 0,024	-	P= 0,024

Tabelle 12 P-Werte MWU Test der Aldosteron/Spirolactonkonzentrationen mit H₂O₂ gegen die entsprechende H₂O₂-Kontrolle

Im Vergleich zwischen den Substanzgruppen bei gleicher Wasserstoffperoxidgabe konnte nach 24 h kein signifikanter Unterschied dargestellt werden.

Für den Vergleich zwischen den Substanzgruppen bei Zugabe von 150 µg Wasserstoffperoxid konnte ein signifikanter Unterschied nach 48 h nachgewiesen werden. Spirolacton 1 µg führte sowohl bei vitalen Zellen, als auch in der Gesamtzellzahl zu einer signifikanten Zellverminderung. Eine erhöhte Population toter Zellen konnte für diese Konzentrationen nicht signifikant nachgewiesen werden.

Eine erhöhte Mortalität der Zellen konnte für jede der Substanzen ausgeschlossen werden. Die Populationen der avitalen Zellen bewegten sich zu jedem Zeitpunkt in vergleichbaren Mengenverhältnissen (Kruskal Wallis Test 24 h p=0,349; 48h p=0,159).

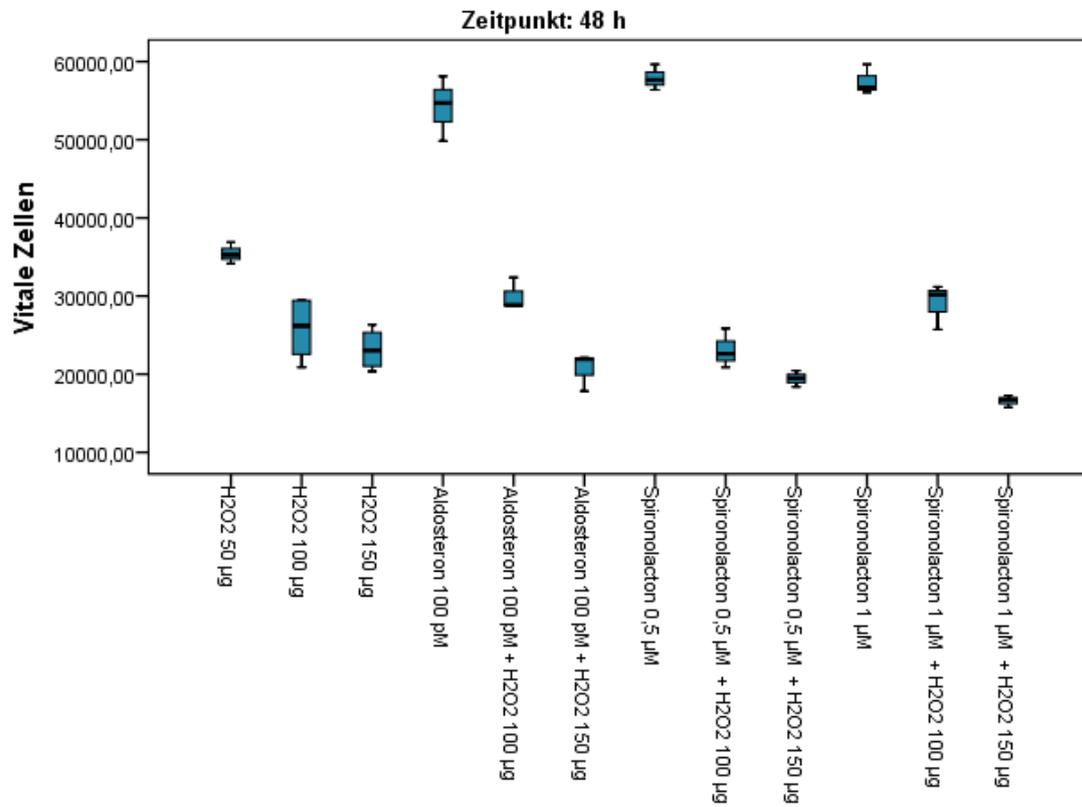


Abbildung 49 Einfluss auf vitale Zellen nach 48 h unter oxidativem Stress

Für den Vergleich zwischen den Substanzgruppen bei Zugabe von 150 µg Wasserstoffperoxid konnte ein signifikanter Unterschied nach 48 h nachgewiesen werden. Spironolacton 1 µg führte sowohl bei vitalen Zellen, als auch in der Gesamtzellzahl zu einer signifikanten Zellverminderung. Eine erhöhte Population toter Zellen konnte für diese Konzentrationen nicht signifikant nachgewiesen werden.

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

3.5.1 Optische Kohärenztomographie

Einen Überblick über die Ergebnisse der OCT bietet die Tabelle 13.

	Zentrale Retinadicke	Laserherddurchmesser	CNV
Aldosteron 3dpl	Signifikant Erhöht zur Kontrolle	Kein Unterschied	-
Spironolacton 3 dpl	Kein Unterschied	Kein Unterschied	-
Aldosteron 14 dpl	Kein sign. Unterschied	Kein Unterschied	Tendenziell größer als Kontrolle, signifikant größer als bei Spironolacton
Spironolacton 14 dpl	Signifikant Verringert zur Kontrolle	Kein signifikanter Unterschied; Tendenziell etwas kleiner als bei der Kontrollgruppe	Tendenziell kleiner als Kontrolle signifikant kleiner als CNV bei Aldosteron
Dynamik LH-Durchmesser 3dpl – 14 dpl	-	Größenzunahmetendenz aller Gruppen Unter Aldosteron signifikante Vergrößerung des Laserherdes	-

Tabelle 13 Zusammenfassung der Ergebnisse der optischen Kohärenztomographie

3.5.2 Fluoreszenzangiographie

Eine tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der Fluoreszenzangiographie für die einzelnen Phasen und Zeitpunkte wird in Tabelle 14 dargestellt.

	Leckage	Laserherdgröße	Verhältnis Leckage zu Laserherdgröße
Aldosteron 3 dpl	In der Frühphase tendenziell erhöht (nicht signifikant)	Kein signifikanter Effekt	Kein signifikanter Effekt
Aldosteron 14 dpl	In der Früh- und Spätphase tendenziell erhöht (nicht signifikant)	Kein signifikanter Effekt	Kein signifikanter Effekt
Spironolacton 3 dpl	In der Früh- und Spätphase minimal verringert (nicht signifikant)	Kein signifikanter Effekt	Kein signifikanter Effekt
Spironolacton 14 dpl	In der Früh- und Spätphase minimal verringert (nicht signifikant)	Kein signifikanter Effekt	Kein signifikanter Effekt
Dynamik LH-Größe 3 dpl – 14 dpl		Kontrolle und Spironolacton: signifikante LH- Größenabnahme	

Tabelle 14 Zusammenfassung der Ergebnisse der Fluoreszenzangiographie

3.5.3 Immunhistochemie

Eine übersichtliche Zusammenstellung der Effekte von Aldosteron und Spironolacton auf die Expression der einzelnen Proteine in den immunhistochemischen Untersuchungen und die Expressionsmuster der unbehandelten Retina wird in Tabelle 15 aufgeführt.

	Expression im Bereich des Laserherdes im Vergleich zu Kontrolle		Expressionsmuster in der Retina
	Aldosteron	Spirolacton	
Isolektin B4 3 dpl	Kein Effekt	Kein Effekt	Gefäßfärbung CNV und Choroidea Mikroglia: IB4 Färbung in der inneren Körnerschicht
Isolektin B4 14 dpl	erhöht	Verringert	Körnerschicht
VEGF 3dpl	Erhöhte Expression	Verringerte Expression	Gesamte Retina besonders stark in Ganglienzellschicht und RPE,
VEGF 14 dpl	Kein reproduzierbarer Effekt	Kein reproduzierbarer Effekt	etwas geringer in innerer und äußerer Körnerschicht Expression im LH
Claudin 5 3 dpl	Leicht verringerte Expression	Kein reproduzierbarer Effekt	Ganglienzellschicht, Innere Körnerschicht, äußere Körnerschicht Expression besonders über dem LH,
Claudin 5 14 dpl	Verringerte Expression	Kein reproduzierbarer Effekt	gefäßassoziiert
ZO-1 3 dpl	Kein reproduzierbarer Effekt	Kein reproduzierbarer Effekt	Ganglienzellschicht, innere und äußere Körnerschicht, äußere

ZO-1 14 dpl	Kein reproduzierbarer Effekt	Kein reproduzierbarer Effekt	plexiforme Schicht, RPE, im LH
VE-Cadherin 3dpl	Kein reproduzierbarer Effekt	Kein reproduzierbarer Effekt	Ganglienzellschicht, Innere und äußere Körnerschicht, RPE, gefäßassoziiert,
VE-Cadherin 14 dpl	Verringerte Expression	Kein reproduzierbarer Effekt	
Vimentin 3 dpl	Erhöhte Expression	Verringerte Expression	Ganglienzellen, RPE, Laserherd, äußere plexiforme Schicht,
Vimentin 14 dpl	Kein reproduzierbarer Effekt	Kein reproduzierbarer Effekt	
Aquaporin 4 3 dpl	Kein reproduzierbarer Effekt	Kein reproduzierbarer Effekt	zwischen innerer und äußerer Grenzmembran, Ganglienzellen, äußere Körnerschicht, äußere plexiforme Schicht, Ausprägung besonders zwischen LH und Retina
Aquaporin 4 14 dpl	Kein reproduzierbarer Effekt	Kein reproduzierbarer Effekt	
GLUT-1 3 dpl	Kein reproduzierbarer Effekt	Kein reproduzierbarer Effekt	RPE!!, geringe Ausprägung Ganglienzellen und äußere Körnerschicht
Glut -1 14 dpl	Kein reproduzierbarer Effekt	Kein reproduzierbarer Effekt	

Tabelle 15 Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

3.5.4 Humane Retinaendothelzellen

Eine übersichtliche Zusammenfassung der zellbiologischen Versuche bietet Tabelle 16.

Humane Retinaendothelzellen - Zellkultur				
	Zellen gesamt	Vitale Zellen (CFSE)	Tote Zellen (Hoechst)	Proliferationszyklen 24 h – 72 h
24 h Aldosteron (100 pM, 1 nM, 100 nM, 1 µM) Kontrolle Spironolacton (0,5 – 4 µM)	Keine signifikanten Unterschiede nachweisbar KWT: p=0,109	Keine signifikanten Unterschiede nachweisbar KWT: p =0,154	Keine signifikanten Unterschiede nachweisbar KWT: p =0,891	Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proliferationszyklen (t 24 – t 72 = 48 Stunden) der verschiedenen Gruppen KWT p=0,421
48 h Aldosteron (100 pM, 1 nM, 100 nM, 1 µM) Kontrolle Spironolacton (0,5 - 4 µM)	Keine signifikanten Unterschiede nachweisbar KWT p= 0,054	Keine signifikanten Unterschiede nachweisbar KWT: p =0,062	KWT: p =0,036 Aldosteron 100 nM und 1 µM geringere Anzahl toter Zellen (MWT p= 0,024 und 0,053) Spironolacton 2 µM (MWT p= 0,0032) größere Menge toter Zellen	
72 h	Keine signifikanten	KWT p=0,018	Keine signifikanten	

Aldosteron (100 pM, 1 nM, 100 nM, 1 µM) Kontrolle Spironolacton (0,5 - 4 µM)	Unterschiede zwischen den Gruppen KWT p=0,072	Aldosteron 100 pM (MWU: p= 0,002) und Spironolacton 2 µM (MWU p=0,002) beide signifikant höhere Anzahl lebender Zellen	Unterschiede nachweisbar KWT: p =0,501	
---	--	---	--	--

Tabelle 16 Zusammenfassung der Ergebnisse der zellbiologischen Versuche mit Retinaendothelzellen

3.5.5 Humane Retinaendothelzellen und oxidativer Stress

Die Wirkung auf von Aldosteron und Spironolacton auf hREZ unter oxidativem Stress wird in Tabelle 17 übersichtlich zusammengefasst.

	Zellen gesamt	Lebende Zellen	Tote Zellen
H2O2	Signifikant weniger Zellen mit jeder H2O2 Konzentration Oxidativer Stress wirkt antiproliferativ	Signifikant weniger vitale Zellen mit jeder H2O2 Konzentration Oxidativer Stress wirkt antiproliferativ	Kein signifikanter Effekt Oxidativer Stress wirkt nicht toxisch auf hREC
H2O2 und Aldosteron	Nach 48 h: Signifikant höhere Gesamtzellzahlen bei H2O2 100 µg mit 100 pM Aldosteron im Vergleich zur	Kein signifikanter Effekt	Kein signifikanter Effekt

	Kontrolle mit H ₂ O ₂ 100 µg Aldo 100 pM wirkte vereinzelt proproliferativ		
H ₂ O ₂ und Spironolacton	Nach 48 h: Spironolacton 2 µM erniedrigte die Anzahl der mit 150 µg H ₂ O ₂ inkubierten Zellen Signifikant Spironolacton 1 µM wirkte antiproliferativ	Nach 48 h: Spironolacton 2 µM erniedrigte die Anzahl der mit 150 µg H ₂ O ₂ inkubierten Zellen Signifikant Spironolacton 1 µM wirkte antiproliferativ	Kein signifikanter Effekt

Tabelle 17 Zusammenfassung der Ergebnisse der zellbiologischen Versuche unter oxidativem Stress

4 Diskussion

4.1 Einfluss auf klinische Retina- und Laserherdmorphologie

4.1.1 Zentrale Dicke

Aldosteron und Spironolacton entsprechen in den Ergebnissen der antizipierten antagonistischen Wirkung. Während Aldosteron innerhalb der ersten drei Tage signifikant und nach vierzehn Tagen tendenziell bei Blick auf den Wertebereich die Retinadicke vergrößert, reduziert Spironolacton diese nach vierzehn Tagen signifikant.

Eine Vergrößerung der Retinadicke im zentralen Bereich des Laserherdes kann durch die Größe der CNV oder durch intra- bzw. subretinale Ödembildung bedingt werden (132).

Eine Zunahme der Retinadicke durch intraretinale Flüssigkeit als Reaktion auf die Aldosteronapplikation ist bereits berichtet worden (187). Hier konnte erstmals gezeigt werden, dass dieser Effekt auch im Modell der laserinduzierten CNV nachweisbar ist. Diese Ergebnisse legen eine Beeinflussung des Wasserhaushaltes des Auges und in besonderem Maße der Retina nahe. Retinale Ödeme resultieren meist aus einer funktionellen Einschränkung der Blut-Retina-Schranke (BRS) (151). Auf den Wasserhaushalt der Retina nimmt Aldosteron über Beeinflussung von Transportproteinen Einfluss. Dies wurde bereits auf die Vermehrung von Transportkanälen (z.B. AQP-4, EnaC) sowie die Verlagerung von AQP-4 als Wasserpore an MZ-Füße und um anliegende vaskuläre Strukturen zurückgeführt. Dadurch wird über AQP4 die Permeabilität der BRS für Flüssigkeit erhöht (187). Einen Effekt von Spironolacton und Aldosteron auf AQP 4 im Laserherd als Erklärung für die zunehmende Retinadicke unter Aldosteron oder den gegenteiligen Effekt durch Spironolacton konnte in unseren immunhistochemischen Versuchen hingegen nicht nachgewiesen werden.

Allerdings konnte ein Einfluss auf Zell-Zell-Verbindungen der BRS detektiert werden. Die Permeabilität der BRS ist, wie eingangs erläutert, neben den Transportproteinen maßgeblich von der Stabilität der Tight- und Adherens-Junctions abhängig. Claudin-5 ist ein barrierestärkendes Protein der TJ, insbesondere in Endothelzellen (5). In der Retina ist der barrierefördernde Effekt von Claudin-5 ebenfalls nachgewiesen (166). Die in unserer Studie nachgewiesene verringerte Expression von Claudin unter Aldosteroneinfluss bietet eine mögliche pathophysiologische Erklärung für die Zunahme der zentralen Laserherddicken unter Aldosteron.

Auch die in unseren Versuchen immunhistochemisch detektierte verringerte Expression des AJ-Proteins VE-Cadherin unter Aldosteroneinfluss könnte zur Destabilisierung der BRS unter

Aldosteron beigetragen haben. Ein Mangel an VE-Cadherin führt zu Permeabilitätssteigerung der BRS und zu einer verminderten Claudin 5 Transkription. Dieser Effekt auf AJ ist sowohl unter Einfluss von VEGF sowie bei oxidativem Stress (ROS) vermehrt beobachtet worden (74). Die Aktivierung bzw. Verstärkung von VEGF oder oxidativem Stress durch das RAAS und zum Teil auch direkt durch Aldosteron konnte bereits mehrfach gezeigt werden (123, 164, 176, 187).

Die Zunahme der zentralen Laserherddicken unter Aldosteron könnte demnach durch Störung der Tight- und Adherens-Junctions entstanden sein. Dieser Effekt des Aldosterons auf die BRS könnte möglicherweise durch Spironolacton antagonisiert werden und somit neue Therapiemöglichkeiten eröffnen.

Die zweite pathophysiologische Hypothese bezüglich der modifizierten zentralen Dicke des Laserherdes – die Wirkung auf die Ausbildung der choroidalen Neovaskularisation – wird ebenfalls durch Aldosteron und Spironolacton beeinflusst. Die verstärkte bzw. verringerte Expression von proangiogenen Substanzen wie VEGF unter Aldosteron bzw. Spironolacton wurde bereits vermutet (123) und konnte von uns immunhistochemisch bestätigt werden. Auch die Gesamtgröße der Neovaskularisation konnte nach 14 Tagen durch Anfärbung der vaskulären Strukturen mit Isolektin B4 als vergrößert unter Aldosteron und verringert unter Spironolacton dargestellt werden. Analoge Ergebnisse zeigten sich für Spironolacton kohärenztomographisch in dieser Arbeit. Die zentrale Dicke der LH in der Spironolactongruppe nach 14 Tagen ist demnach wahrscheinlich auch aufgrund der kleineren CNV verringert.

Der Effekt von Aldosteron bzw. Spironolacton auf die zentrale Dicke der Retina im LH ist also durch Schwächung bzw. Stärkung der BRS sowie durch Förderung bzw. Inhibition der Ausbildung der choroidalen Neovaskularisation pathophysiologisch erklärbar. Da in dieser Arbeit durch Aldosteron und Spironolacton sowohl eine Beeinflussung der CNV als auch der BRS nachgewiesen werden konnte, ist eine multifaktorielle Genese wahrscheinlich.

Die Retinale Dicke ist ein wichtiger klinischer Marker für die Schwere der Beeinträchtigung. Bei Patienten konnte eine negative Korrelation zwischen zentraler Retinadicke in der Fovea und dem Visus der Patienten beobachtet werden (88, 132). Eine Reduktion der Retinadicke ist also ein wichtiges therapeutisches Ziel, sodass eine Spironolactonbehandlung eine wertvolle Therapieergänzung darstellen könnte.

Auch für andere retinale Erkrankungen ist eine Reduzierung der Retinalen Dicke im Bereich der Pathologien durch MR-Antagonismus bereits nachgewiesen worden (44).

4.1.2 CNV-Größe

Die choroidalen Neovaskularisationen nach vierzehn Tagen stellten sich im Vergleich zur Kontrolle durch Aldosteron tendenziell leicht vergrößert und durch Spironolacton deutlich verringert dar. Mit Aldosteron behandelte Tiere entwickelten signifikant größere CNV als mit Spironolacton behandelte Tiere. Nach Annahme einer physiologischerweise vorliegenden Aldosteronkonzentration im Auge führt demnach ein Aldosteronantagonismus mit Spironolacton zu einer signifikant geringeren Ausprägung der CNV als eine Erhöhung der Aldosteronkonzentration durch zusätzliche Supplementation.

Dies steht im Einklang mit der Verringerung der LH-Retina-Dicke durch Spironolacton, welche nach Aussage dieser Ergebnisse zum Teil durch eine geringere Ausprägung der CNV bedingt sein wird.

Daher ist von einer Beeinflussung der Größe der choroidalen Neovaskularisation durch das RAAS und im Besonderen durch Aldosteron und Aldosteronantagonismus auszugehen. Es ist anzunehmen, dass Aldosteron in der Entwicklung von Neovaskularisationen eine Rolle spielt.

Die Inhibierende Wirkung von Aldosteronsuppression auf retinale Neovaskularisationen ist bereits bekannt (45). RAAS-Inhibition durch ACE-Hemmer und AT1-Antagonisten, welche indirekt auch die Aldosteronsynthese inhibieren, führte ebenfalls zur Suppression von retinalen Neovaskularisationen sowie zu einer Verminderung der Expression von VEGF und VEGF-R (125).

Diese Studie berichtet erstmals von einem inhibierenden Effekt des MR-Antagonismus auf die choroidalen Neovaskularisationen. Für andere Bestandteile des RAAS wie Prorenin und ANG II ist bereits eine Beteiligung an der Entstehung von CNVs nachgewiesen worden (128, 152).

Sowohl Prorenin als auch ANG II bewirken im Körper eine vermehrte Expression von Aldosteron (157). Die hier gezeigten Ergebnisse legen nahe, dass ein Teil des dort gezeigten Effektes auf der Aldosteronwirkung beruhen könnte.

Die therapeutischen Möglichkeiten der MR-Antagonisierung zur Behandlung von CNV sollten daher weiter exploriert werden.

4.1.3 LH-Ausdehnung

Die Ausdehnung des Laserherdes wurde in dieser Studie durch zwei Methoden beschrieben. In den Spectral Domain OCT (SD-OCT) Aufnahmen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Laserherddurchmessern gefunden werden. Auch die Fläche der Laserherde in den

Infrarotaufnahmen zur Planung der FAG wies keine signifikanten Unterschiede zwischen Aldosteron, der Kontrolle und Spironolacton auf.

Die Dynamik der beiden Parameter zeigte allerdings kleine Unterschiede.

Der Laserherddurchmesser im OCT, also der Defekt in Bruchscherscher Membran und RPE, war in den Tieren welche vierzehn Tage mit Aldosteron behandelt wurden signifikant größer als in den Tieren welche drei Tage die Aldosteroninjektionen erhielten.

Das RAAS wurde bereits im Zusammenhang mit der erhöhten Expression von Matrixspaltenden Enzymen wie MMP-9 in Verbindung gebracht (92). Eventuell führen solche Mechanismen zu einer Vergrößerung des LH-Durchmessers.

Die LH-Fläche der Kontroll- und Spironolactongruppe war bei den Tieren welche vierzehn Tage behandelt wurden signifikant kleiner als die der Kontroll- und Spironolactongruppe mit drei Tagen Injektionen.

Der Durchmesser und damit auch die Fläche ist maßgeblich von den 75µm Durchmesser des Laserstrahls abhängig. Eine Veränderung im Versuchsverlauf scheint zumindest so gering zu sein, dass die Unterschiede zwischen den Gruppen erst viel später detektiert werden können.

4.1.4 Zusammenfassende Einordnung

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen geschlussfolgert werden, dass die Frage nach dem Einfluss von Aldosteron auf die klinische Ausprägung der laserinduzierten CNV beantwortet werden kann. Aldosteron fördert die klinischen Zeichen der Krankheitsprogression die in Patienten mit Visusbeeinträchtigung einhergehen – Retinale Dicke und Volumen der CNV. Spironolacton übt einen gegenteiligen Effekt aus und sollte als therapeutische Möglichkeit in Betracht gezogen werden.

4.1.5 Methodenkritik und mögliche Fehlerquellen

Wie bereits eingangs erwähnt, ist das Modell der laser-induzierten CNV an Mäusen eine international anerkannte und geeignete Methode zur Erforschung der CNV bei AMD (144). Die Methode ist stark abhängig von der Handhabung des Lasers. Durch konsequente Bedienung des Lasers durch dieselbe erfahrene und qualifizierte Person bei jedem Versuch konnte eine Beeinflussung der Ergebnisse minimiert werden. Allerdings wurde durch die Nutzung junger Tiere der Einfluss degenerativer Veränderungen in den Versuchen dieser Arbeit vernachlässigt. Die optische Kohärenztomographie hat sich in der klinischen quantitativen Beurteilung der CNV bei AMD bewährt (95). Das SD-OCT eignet sich ebenfalls zur Beurteilung

morphologischer Veränderungen in laserinduzierter CNV in Versuchstieren wie Ratten oder Mäusen. Der Durchmesser der CNV kann genauso wie das Volumen ermittelt werden und korrespondiert gut zu ex-vivo untersuchten histologischen Schnitten (113).

Auch die Fluoreszenzangiographie (FAG) ist eine klinische etablierte Methode zur Beurteilung choroidaler Neovaskularisationen welche auch in Versuchstieren regelhaft angewendet wird. Leckage aus choroidalen und retinalen Gefäßen konnte mithilfe von Photoshop hervorragend beurteilt werden und die aus dem Infrarotbild ermittelte Größe des Laserherdes stellte eine Kontrollmethode zur Beurteilung der LH-Größe durch den Eindimensionalen LH-Durchmesser des OCTs dar (48, 49).

Durch Multiplikation der LH-Größe mit der Fluoreszenzintensität der Leckage konnte eine Verzerrung der Ergebnisse verhindert werden. Großflächige schwache Leckagen würden bei singulärer Betrachtung der Fluoreszenzintensität als klinisch unbedeutendere Befunde gewertet, obwohl sie klinisch ebenso zu Visusabfall führen können. Diese Befunde erhielten damit den gleichen Einfluss auf das Ergebnis wie kleine stark fluoreszierende Leckagebereiche.

OCT und FAG sind damit optimal für die Beurteilung der klinischen Ausprägung und morphologischen Veränderungen unter Therapie der laserinduzierten CNV geeignet. Allerdings hätten wohlmöglich durch die Wahl eines Versuchszeitraums von sieben Tagen prägnantere Ergebnisse gezeigt werden können, da Leckage und CNV nach Laserinduktion der CNV ihr Maximum nach sieben Tagen erreichen, um sich dann langsam über mehrere Wochen wieder zu reduzieren (113). Zur Reduktion der Gesamtanzahl der Versuchstiere wurde auf diesen zusätzlichen Zeitpunkt verzichtet. Dieser hätte zumindest in der ex-vivo Auswertung zu einer deutlichen Steigerung der Versuchstieranzahl geführt.

Mögliche Fehlerquellen ergeben sich aus dem Versuchsaufbau und müssen bei der Ergebnisbeurteilung berücksichtigt werden. Da stets mehrere Laserherde und Augen pro Tier als eigenständige Versuchseinheiten gewertet wurden kann eine Koabhängigkeit nicht ausgeschlossen werden. Dies konnte in der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt werden. Ein Versuchsaufbau mit einem Laserherd pro Tier hätte allerdings entweder eine sehr kleine Anzahl an Versuchseinheiten oder nicht vertretbar große Mengen an Tieren zur Folge gehabt. Daher ist es bei solchen Modellen international üblich, mehrere Laserherde pro Versuchstier zu verwenden.

4.2 Einfluss auf Blut-Retina-Schranke

4.2.1 Leckage in der FAG

Die langsamere Anflutung des Fluoreszeins in den Mäuseretinae mit Maximum in der Spätphase lässt sich durch die unterschiedliche Applikation erklären. Während FAGs beim menschlichen Patienten intravenös durchgeführt werden, nahmen wir bei den Mäusen die Injektionen intraperitoneal vor.

Signifikante Veränderungen der Leckage konnten in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Ein Blick auf die Grafiken zeigt jedoch Tendenzen, die im Einklang mit der Hypothese stehen, dass Aldosteron Leckage fördert und Spironolacton sie verringert. So ist die Fluoreszenzintensität der Aldosterongruppe nach drei Tagen in der Frühphase und vierzehn Tagen in der Früh- und Spätphase im Median im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Die Fluoreszenzaktivität der Spironolactongruppe bewegt sich im Median stets minimal unter der Kontrolle.

Die Korrelation der MFI zur Größe ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Die Multiplikation der MFI mit der Fläche des Laserherdes sollte einen allgemeinen Faktor der Schwere der Läsion darstellen, in dem beide Parameter in einen Wert integriert werden.

Diese Veränderungen lassen aufgrund fehlender Signifikanzen keine klaren Aussagen in Bezug auf die Beeinflussung von Leckage und BRS zu. Insgesamt konnte Aktivierung oder Inhibierung des MR-Rezeptors keinen signifikanten Effekt auf die Leckage aus CNV ausüben. Ebenfalls keine Veränderungen der Leckage in der FAG konnte bei Patienten mit entzündlichem zystoidem Makulaödem, welche mit Lisinopril behandelt wurden, gezeigt werden (170).

Die hier gesehenen Tendenzen der Leckageförderung durch Aldosteron und Hemmung durch Aldosteron an den verschiedenen Zeitpunkten stehen im Einklang mit den hier gezeigten Effekten auf die BRS, sowie mit anderen Ergebnissen aus der Literatur. Durch die verminderte Expression von Claudin-5 kann es in Geweben zu einer vermehrten Permeabilität der Blutgefäße für kleine Moleküle wie Fluoreszein geben (28, 131). Sollte die hier beobachtete Tendenz trotz nicht vorhandener Signifikanz korrekt sein, bieten die hier gezeigten Effekte von Aldosteron auf Claudin-5 eine valide Erklärung für die Leckage. Dies würde ebenfalls in Einklang mit der aktuellen Literatur in Bezug auf das RAAS stehen.

In einem transgenen Mausmodell mit erhöhten ANG II Leveln konnte ebenfalls ein Anstieg der Leckage aus hypertensiven Exsudaten beobachtet werden, den Reichhart et al einer Veränderung der BRS zuschrieben (147).

Auch im Mausmodell der laserinduzierten CNV konnte ein positiver Effekt der RAAS-Inhibition auf die Leckage nachgewiesen werden. Die medikamentöse Inhibition der Umwandlung von ANG I zu ANG II durch einen ACE-Hemmer resultierte in deutlich reduzierter Leckage (110).

Diese Studien verwendeten allerdings ein qualitatives, subjektives Bewertungssystem der FAG-Aufnahmen (110), wohingegen unsere Quantifizierbare Auswertungsmethode belastbarere Ergebnisse generiert.

Insgesamt ist die internationale Datenlage zur Modifizierung der Leckage in FAG durch Bestandteile des RAAS sehr begrenzt. Zum Einfluss von Aldosteron auf Leckagen bei CNV ist nichts bekannt. An anderen Geweben mit Barrierefunktion ist eine Wirkung von Aldosteron auf TJ-Bestandteile wie Claudine bereits nachgewiesen worden (5).

Aufgrund der im Großteil der MFI-Werte konsistenten Tendenzen, dem Hinweis auf BRS-Beteiligung durch die Beeinflussung der retinalen Dicke und des in anderen Studien nachgewiesenen Effektes des RAAS auf die BRS war jedoch eine weiterführende Untersuchung indiziert.

4.2.2 Einfluss auf Tight und Adherens Junctions

Die hier durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen geben Anlass zur Vermutung, dass Aldosteron und Aldosteronantagonismus einen Einfluss auf Tight- und Adherens Junctions ausüben.

Ein Einfluss von Aldosteron auf Claudine in Form einer Expressionserhöhung von Claudin-8 im Colon ist bereits nachgewiesen worden. Im Colon hat Aldosteron einen barrierefördernden Effekt (5).

In dieser Studie wurde in Bezug auf Claudin 5 eine gegenteilige Beobachtung gemacht. Claudin-5 ist ein barrierestärkendes Protein der TJ, insbesondere in Endothelzellen (5). Claudin-5 wurde in der Retina wie erwartet gefäßassoziiert, aber auch in der Ganglienzellschicht sowie in der inneren und äußeren Körnerschicht exprimiert.

Auch im Laserherd wurde Claudin-5 nachgewiesen, eine größere Konzentration befand sich oft auch direkt über dem Laserherd. Die neugebildeten Gefäße der CNV enthalten also ebenfalls Claudin-5.

Nach drei Tagen Aldosteronbehandlung konnte im Bereich des Laserherdes eine leicht verminderte, nach vierzehn Tagen Aldosteronbehandlung eine deutlich verminderte Expression von Claudin-5 dargestellt werden. Spironolacton zeigte keinen Effekt.

Eine erhöhte Expression von Claudin-5 verbessert durch Induktion einer vermehrten Claudin-1 und verminderten Claudin-2 Expression die Barrierefunktion und senkt Permeabilität der inneren BRS (166). Dementsprechend führt eine niedrige Konzentration an Claudin-5 zu einer erhöhten Permeabilität.

Der hier nachgewiesene Effekt des Aldosterons – Beeinflussung der inneren BRS durch Verminderung der Expression des TJ-Proteins Claudin 5 in den Gefäßen der CNV – kann zu retinaler Ödembildung an diesen Stellen führen und damit ursächlich für die vergrößerte zentrale Dicke des Laserherdes in der Aldosterongruppe sein. Auch zeitlich gibt es hier, mit der starken Verminderung des Claudin-5 und damit wahrscheinlich konsekutiv stark erhöhter Permeabilität nach vierzehn Tagen sowie der erhöhten zentralen Dicke der Retina in der Aldosterongruppe im Vergleich zur Kontrolle nach vierzehn Tagen, eine Korrelation, welche die Hypothese unterstützt.

Der komplette Verlust von Claudin-5 in der Blut-Hirn-Schranke führt genauso wie die reversible Blockade von Claudin-5 in der BRS von Mäusen zu einer erhaltenen Barrierefunktion für große Moleküle, jedoch zu einer Permeabilität der Barriere für kleinere Moleküle unter 800 D, wie zum Beispiel Fluorescein (28, 131). Dies erklärt zum einen den Wassereinstrom im Rahmen retinaler Ödembildung, würde allerdings auch eine Erklärung für die tendenziell, wenn auch nicht signifikant, vermehrte Fluorescein-Leckage in der Aldosterongruppe geben.

Auch in vielen retinalen, neovaskulären Erkrankungen, wie diabetischer Retinopathie, ist eine Verminderung von Claudin-5 als Ursache für eine Schwächung der BRS und daraus resultierende Leckage identifiziert worden (155, 180).

Einen Grund für die Verminderung der Claudin-5 Expression durch Aldosteron könnte der Effekt der Substanz auf VE-Cadherin darstellen.

Die Ausbildung von TJs, insbesondere Claudin-5, wird durch AJs gesteuert. Endotheliales VE-Cadherin, ein Molekül der AJs, verstärkt über einen β -Catenin Signalweg die Genexpression von Claudin-5. Ein Mangel an VE-Cadherin führt so zu verminderter Claudin-5 Expression (165). Da in dieser ex-vitro Studie die VE-Cadherin- Expression nach vierzehn Tagen Aldosteroneinfluss erniedrigt, die Claudin-5 Expression aber bereits nach drei Tagen leicht und nach vierzehn Tagen stark erniedrigt war, ist eine Beeinflussung der Claudin-5 Expression über mehrere Signalwege wahrscheinlich. Die initiale Verminderung der Claudin-5 Expression scheint nach vierzehn Tagen durch den VE-Cadherin-Mangel verstärkt zu werden. Aldosteron entfaltet seine volle Wirkung auf die BRS also bei langfristig erhöhtem Aldosteroneinfluss.

Wie aufgrund der bekannten Expression in Endothelien erwartet, wurde VE-Cadherin immunhistochemisch in der Retina und im Choroid gefäßassoziiert dargestellt. Zudem ließ es

sich in der Ganglienzellschicht, der äußeren plexiformen Schicht, dem Stratum neuroepitheliale und im LH nachweisen. Schwache Färbung zeigte sich in der inneren und äußeren Körnerschicht.

Aldosteron reduzierte nach vierzehn Tagen die Expression von VE-Cadherin in den Laserherden. Spironolacton konnte keinen reproduzierbaren Effekt erzielen.

Eine Hemmung an VE-Cadherin löst in der Mikrovaskulatur vieler Gewebe eine langfristige Erhöhung der Permeabilität aus (38). Diese permeabilitätsfördernde Wirkung kann durch Phosphorylierung an der Zellemembran, vermittelt beispielsweise durch VEGF, enzymatische Spaltung oder durch Internalisierung von VE-Cadherin in die Zelle ausgelöst werden (43, 75). Wie bereits erwähnt schwächt gerade ein chronischer Mangel an VE-Cadherin die BRS durch eine verminderte Expression des essentiellen TJ-Proteins Claudin-5 (74). Dies erklärt auch, warum die zentrale Dicke vom Aldosteron bzw. Aldosteronantagonismus erst nach vierzehn Tagen signifikant beeinflusst wurde.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass über die Reduzierung der VE-Cadherin- und Claudin-5-Expression, Aldosteron negativ auf die Barrierestruktur und -funktion der BRS wirkt. Wahrscheinlich hat dies eine permeabilitätsfördernde Wirkung zur Folge.

Eine positive Wirkung auf die BRS durch Spironolacton konnte nicht nachgewiesen werden. Weitere Studien sollten zeigen, ob die Aldosteronwirkung auf die BRS durch simultane Spironolactongabe antagonisiert werden können.

VE-Cadherin beeinflusst neben der BRS auch die Angiogenese und hat dabei über verschiedene Signalwege pro- und antiproliferative Eigenschaften.

In der Angiogenese ist die Zell-Zell-Adhäsion der Zellen durch VE-Cadherin besonders wichtig. Ein Mangel an VE-Cadherin hemmt die Aussprossung neuer aus bestehenden Gefäßen - Sprouting - und hat auch dadurch einen hemmenden Effekt auf Neovaskularisationen (139). Der dadurch resultierende antiangiogene Effekt einer Inhibition der Zell-Kontakt-herstellenden VE-Cadherin-Region auf retinale Neovaskularisationen konnte bereits für die Sauerstoff-induzierte Retinopathie nachgewiesen werden (129).

Über eine Inhibition der VEGF-Wirkung und Unterstützung der durch TGF- β ausgelösten antiproliferativen Signalwege wirkt VE-Cadherin andererseits antiproliferativ auf Endothelzellen.

Durch Bindung an den VEGF-2 Rezeptor inhibiert VE-Cadherin im Rahmen der Kontakt-Inhibition die proliferative Wirkung von VEGF und unterdrückt damit indirekt die Angiogenese (104).

TGF- β kann auf Endothelzellen je nach über verschiedene Rezeptoren je nach Kontext pro- oder antiproliferativ wirken (149). VE-Cadherin ist essentiell für die antiproliferative und antimigrative Wirkung des TGF- β Signalweges auf Endothelzellen. Ein Mangel an VE-Cadherin wirkt damit indirekt proliferativ (149).

In atherosklerotischen und neovaskulären Gefäßabschnitten ist die verminderte Expression von VE-Cadherin mit einer vermehrten Einwanderung von Immunzellen verbunden. Ein Mangel an VE-Cadherin könnte also inflammatorische Prozesse in der CNV unterstützen (19).

Der Effekt, den Aldosteron über die verminderte VE-Cadherin-Expression auf die Angiogenese hat, kann aufgrund der bipolaren Wirkung des VE-Cadherins noch nicht abschließend beantwortet werden. Auch eine zeitgerechte Therapie könnte in diesem Behandlungsansatz entscheidend sein. Daher sollten weitere Projekte angeschlossen werden um die verschiedenen Stadien der CNV Entstehung sowie die Rolle des VE-Cadherins zu den verschiedenen Zeitpunkten weiter zu beleuchten.

Ein weiteres wichtiges Strukturprotein der TJs, ZO-1, wurde in der Retina ebenfalls gefäßassoziiert in Retina und Choroid, sowie besonders in der Ganglienzellschicht (bzw. der inneren Grenzmembran), der äußeren plexiformen Schicht, sowie dem Stratum neuroepitheliale exprimiert.

ZO-1 hat besonderen Einfluss auf die äußere BRS, das RPE, wo ein Mangel zu Dysfunktion und Leckagen führen kann (76).

Weder Aldosteron noch Spironolacton hatten einen Einfluss auf die ZO-1 Expression.

Aldosteron beeinflusst die damit innere BRS also negativ und erhöht die Permeabilität durch eine Senkung der Claudin-5 Expression nach drei und nach vierzehn Tagen, sowie der VE-Cadherin Expression nach vierzehn Tagen. Ein Einfluss auf die TJ der äußeren BRS konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Fehlende Wirkung von Spironolacton auf die Claudin-5 sowie die VE-Cadherin-Expression kann vielleicht durch den Wirkmechanismus erklärt werden. Spironolacton hemmt die Wirkung von Aldosteron am MR kompetitiv, sodass Spironolacton nur die vorhandene Aldosteron-Wirkung aufheben, nicht aber eine eigene Wirksamkeit am MR aufbauen kann (58). Weitere Versuche sollten zeigen, ob die Aldosteronwirkung auf die Claudin-5 Expression durch simultane Gabe von Spironolacton aufgehoben werden kann.

4.2.3 Einfluss auf den Stoffaustausch – AQP-4, Vimentin, GLUT-1

Vimentin konnte in der Retina in der Ganglienzellschicht, im RPE und in der äußeren plexiformen Schicht nachgewiesen werden. Etwas schwächer zeigten sich vertikale Ausläufer, welche den Vimentin exprimierenden Müller Zellen (MZ) zugeordnet werden können (146). Die starke Fluoreszenz in der äußeren plexiformen Schicht entspricht dabei den Endfortsätzen der MZ, die Fluoreszenz der Ganglienzellschicht den apikalen Fortsätzen der MZ. Damit erstrecken sich die Müller-Zellen von der inneren bis zur äußeren Grenzmembran (138). Auch im Laserherd wurde Vimentin dargestellt.

Bei Vimentin handelt es sich um ein Intermediärfilament, welches sich in mesenchymalen Zellen findet. Besonders häufig ist es in mesenchymalen Progenitorzellen in der frühen Entwicklung (33). Daher sind neben den Müllerzellen eine Reihe anderer Strukturen bekannt, welche von Vimentin-Antikörpern immunhistochemisch angefärbt werden.

Immunohistochemische Antikörper gegen Vimentin färben ebenfalls Astrozyten mit horizontalen Ausläufern, Astrozyten in der Nähe von Blutgefäßen, einige Horizontalzellen der inneren Körnerschicht und einige Gefäßstrukturen (138).

Im Laserherd bewirkte Aldosteron nach vierzehn Tagen eine Erhöhung und Spironolacton eine Verminderung der Vimentin-Expression. Da eine deutlich geringere Co-Färbung mit AQP-4 vorlag als bei den MZ handelt es sich möglicherweise um MZ mit einer veränderten Expression bzw. Lokalisation des AQP-4 oder um andere Vimentin exprimierende Zelltypen.

Vimentin-positive mesenchymale Vorläuferzellen sind ein wichtiger Bestandteil der Vaskulogenese des Choroids. Im Laufe der Reifung zu Endothelzellen, Perizyten und Monozyten (später Gewebsmakrophagen) wird Vimentin in den mesenchymalen choroidalen Zellen herunterreguliert (33). Endotheliale Vorläuferzellen die von den Angioblasten der Embryogenese abstammen zirkulieren auch bei Erwachsenen im Blut und treten vermehrt in Geweben mit aktiver Angiogenese auf (8). Wahrscheinlich spielt die Reaktivierung diese Vorläuferzellen eine Rolle im Rahmen der Pathogenese choroidaler Neovaskularisationen (33). Die vermehrte Expression von Vimentin in den choroidalen Neovaskularisationen könnte ein Zeichen der Reaktivierung der mesenchymalen Stammzellen bzw. endothelialer Vorläuferzellen sein.

Drei Tage nach Laserbehandlung, also bei Ausbildung der CNV, zeigte sich eine verstärkte Vimentinexpression in den Laserherden der Aldosterongruppe entgegen der Kontrolle, sowie eine verminderte Vimentinexpression durch Spironolacton im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies könnte einen Eingriff von Aldosteron bzw. Aldosteronantagonismus in die Reaktivierung der Vorläuferzellen/mesenchymaler Stammzellen im Rahmen der Pathogenese der CNV sein.

Aldosteron würde also fördernd auf die Reaktivierung und damit auf die Entstehung der CNV wirken, während Spironolacton diese hemmt.

Nach vierzehn Tagen konnte kein Unterschied der Vimentinexpression zwischen den einzelnen Gruppen mehr festgestellt werden. Es ist daher anzunehmen, dass die Beeinflussung der Vimentin positiven Zellen – seien es nun MZ oder reaktivierte endotheliale Vorläuferzellen – insbesondere in die Entstehung und Ausprägung der CNV eingreift. Weitere Versuche sollten erfolgen um die genaue Zugehörigkeit des Vimentins in den Laserherden zu ergründen, sowie den genauen Zeitpunkt der Mineralokortikoidwirkung festzustellen um optimale Therapieoptionen ableiten zu können.

Ebenfalls Vimentin-positiv sind Fibroblasten (32).

In und um den Bereich der CNV-Membran der laserinduzierten CNV der Maus herum bildet sich eine fibröse Membran aus. An Tag sieben ist das Maximum der Neovaskularisation, bis zum Zeitpunkt von vierzehn Tagen nach Laserbehandlung nimmt der fibröse Anteil der Membran zu (113). Durch das Vimentin könnten demnach auch Fibroblasten angefärbt worden sein, welche im Zeitpunkt von vierzehn Tagen post Laser die Ausbildung einer fibrösen Membran bedingen.

Die Induzierung von Proliferation renaler und kardialer Fibroblasten durch Aldosteron ist bereits nachgewiesen worden (90, 162). Aldosteron fördert die kardiale Fibrosierung im Rahmen der Herzinsuffizienz und trägt damit zur Progression der Erkrankung bei. Dieser Effekt kann durch Spironolacton antagonisiert werden (24). Subretinale Fibrose entwickelt sich häufig als Endstadium der CNV und trägt zum Visusverlust bei. Auch im Rahmen der Anti-VEGF-Therapie kommt eine subretinale Fibrose regelhaft vor und schränkt den Therapieerfolg ein (1). Demnach könnte eine Verringerung der Fibrose durch Aldosteronantagonismus eine prognoseverbessernde Addition der Anti-VEGF-Therapie sein.

Die vermehrte Ausbildung vimentinpositiver Zellen drei Tage nach der Laserbehandlung spricht gegen eine Fibrosierungsreaktion. Wahrscheinlicher ist das tatsächliche Vorliegen einer Reaktivierung mesenchymaler Stammzellen oder die Aktivierung vimentinpositiver endothelialer Vorläuferzellen des Choroids.

Aldosteron kann Müller-Zellen aktivieren und nimmt Einfluss auf ihre Elektrolyt- und Wasserkanäle wie AQP-4 und Kaliumkanäle (187).

AQP-4 konnte in der Retina über die gesamte Ausdehnung der Neuroretina entlang vertikaler Zellausläufer zwischen innerer und äußerer Grenzmembran nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich aufgrund der ähnlich strukturierten Vimentin-Färbung am ehesten um AQP-4 in der Membran der Müller-Zellen. Des Weiteren zeigte sich eine Expression besonders in der

Ganglienzellschicht, der äußeren Körnerschicht und der äußeren plexiformen Schicht. Die stärkste Expression zeigte sich in der äußeren plexiformen Schicht. Müller Zellen exprimieren AQP-4 besonders an Bereichen, die Synapsen oder Gefäße ummanteln (172). Dies erklärt die Expression in der äußeren plexiformen Schicht.

Im Bereich der CNV des Laserherdes war nur eine dezente Anfärbung von AQP-4 möglich, die Hauptausprägung von AQP-4 in Bezug auf die Läsion befand sich zwischen LH-CNV und Retina. In Betrachtung des Laserherdes im Verbund mit der unbeschädigten Retina ist zu sehen, dass die AQP-4 Expression über der CNV des Laserherdes aus der starken Expression in der äußeren plexiformen Schicht hervorgeht. Auch dort ist bei genauerer Betrachtung eine Co-Färbung mit Vimentin vorhanden. Daher handelt es sich am ehesten um eine vergrößerte Ansammlung von Müller-Zellen. Dies erscheint auch durch die o.g. Expression an Bereichen, die Synapsen oder Gefäße, wie zum Beispiel Neovaskularisationen, ummanteln plausibel (172). Die Müllerzellen organisieren sich also a.e. mit ihren AQP-4 anliegend an die CNV.

Aldosteron und Spironolacton hatten keinen nachweisbaren Effekt auf den immunhistochemischen Nachweis und damit die Expression von AQP-4. Die fehlende Wirkung auf den transzellulären Wassertransport impliziert, dass die Beeinflussung retinaler Ödeme durch MR-Beeinflussung über parazelluläre Wege im Rahmen der BRS-Modifikation stattfindet.

Ein Einfluss von Aldosteron und Spironolacton auf AQP-4 in der Retina wurde bereits in der Literatur beschrieben. Intravitreale Aldosteroninjektionen steigerten die AQP-4 Expression und förderten die Ausbildung dieser Poren an den apikalen Seiten der Müller Zellen. Durch die kurze Versuchsdauer von 24 h kann hingegen nur von einem kurzfristigen Effekt gesprochen werden (187). Zaoh et al beschrieben auch eine Verlagerung der AQP-4 Poren durch Aldosteroneinfluss. Zusätzlich zu der Verstärkung der generellen Ausprägung an den MZ-Füßen und um Gefäße kommt es zu einer Ausprägung an der inneren Grenzmembran (187).

Ein weiterer wichtiger Akteur des Stoffaustausches über die BRS ist GLUT-1. Die stärkste GLUT-1 Markierung fand im RPE statt. GLUT-1 ist der wichtigste Glucosetransporter der BRS (118). So ist es nicht weiter verwunderlich, dass sich GLUT-1 hauptsächlich an der äußeren BRS, dem RPE und etwas schwächer markiert an der inneren BRS, den Endothelien nachweisen lässt. Eine geringe Ausprägung zeigte sich in der Ganglienzellschicht und der äußeren Körnerschicht. GLUT-1 wird ebenfalls von den Plasmamembranen der MZ exprimiert (118). Ein Einfluss von Aldosteron wurde bislang nicht nachgewiesen.

GLUT-1 spielt eine wichtige Rolle in der Beeinflussung der BRS im Rahmen der Diabetischen Retinopathie, da der Transporter hauptverantwortlich für den Glucosetransport in die Retina ist

und bei Hypoglykämie auch eine erhöhte Konzentration der Glucose in der Retina festgestellt wurde (115).

Eine Inhibition des RAAS mit ACE-Hemmern senkt die Glucosekonzentration, allerdings ohne einen Einfluss auf die Expression von GLUT-1 (186). Die Rolle des MR und damit von Aldosteron und Spironolacton ist bislang unbekannt.

Auch eine Verwicklung des GLUT-1 in die Pathogenese der choroidalen Neovaskularisation konnte bislang nicht nachgewiesen werden.

Aldosteron und Spironolacton konnten auch in dieser Studie keinen Einfluss auf die Expression des Glucose Transporters GLUT-1 ausüben. Die Wirkung von Aldosteron auf die BRS bezieht den GLUT-1 wahrscheinlich nicht mit ein.

4.2.4 Zusammenfassende Einordnung

Der Zielsetzung der Arbeit entsprechend konnte ein Effekt von Aldosteron auf die Blut-Retina-Schranke nachgewiesen werden. Zwar konnten klinisch in der FAG nur Tendenzen einer Einschränkung der Leckage und damit Schwächung der BRS durch Aldosteron und ein antagonistischer Effekt des Spironolactons beobachtet werden, aber die immunhistochemischen Veränderungen zeigen einen klaren Effekt der Substanzen. Aldosteron wirkt dabei durch Verminderung der Expression von Claudin-5 und VE-Cadherin permeabilitätsfördernd. Weitere Versuche mit Simultangabe der Substanzen sollten folgen um zu zeigen, ob dieser Effekt durch Spironolacton bei überhöhten Aldosteronleveln kompetitiv revidiert werden kann.

Der ebenfalls nachgewiesene Effekt auf die VEGF-Expression führt zu einer Permeabilitätssteigerung und Schwächung der Barrierefunktion durch Aldosteron, bzw. Permeabilitätssenkung und Stärkung der Barrierefunktion durch Spironolacton.

Der antizipierte Einfluss des RAAS auf den Stoffaustausch über die Beeinflussung der Müllerzellen und ihrer Aquaporine konnte nicht nachgewiesen werden. Die fördernde Wirkung von Aldosteron auf vimentinpositive Zellen ist eher nicht einer Beeinflussung der BRS zuzuordnen. Am ehesten handelt es sich dabei um eine Aktivierung vimentinpositiver endothelialer Vorläuferzellen im Rahmen der Neovaskularisation und bedeutet eine Förderung der Angiogenese durch Aldosteron.

4.2.5 Methodenkritik und mögliche Fehlerquellen

Im Maus-Modell der laser-induzierten CNV kommt es regelhaft zu Leckage im Bereich der Laserherde (49). Fluoreszein wird physiologischerweise durch die Blut-Retina-Schranke im Gefäßsystem gehalten. Klinisch äußert sich eine Schwächung der Barrierefunktion in Leckage

aus retinalen und choroidalen Gefäßen in die Retina. Daher ist die FAG für die allgemeine funktionelle Beurteilung der inneren und äußeren Retinaschranke in diesem Mausmodell optimal geeignet. Wie im vorherigen Kapitel bereits beschrieben handelt es sich um eine klinisch und experimentell etablierte Methode (49). Durch unsere quantifizierbare Methode werden die Ergebnisse zusätzlich belastbarer.

Für die weiterführende explorative Analyse von Expressionsmustern der für die Blut-Retina-Schranke relevanten Proteine war die Immunhistochemie gut geeignet. Aufgrund der Subjektivität der Beurteilung der Aufnahmen sowie der schwer möglichen Quantifizierbarkeit kann diese Methode allerdings nur zur qualitativen Darstellung eines Zusammenhanges genutzt werden. Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse müssen damit als Hinweise auf Zusammenhänge und Anstoß zu weiterer Forschung betrachtet werden. Für die Verifizierung und weitere Beschreibung des Zusammenhanges muss stets eine quantitative Methode angeschlossen werden. Hierfür eignen sich besonders die Bestimmung der Genexpression mittels Real-Time Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) oder ein quantitativer Proteinnachweise mittels Western-Blot.

Diese Methoden sind aufwendig und mit einem hohen Ressourcenverbrauch verbunden. Die Immunhistochemie hingegen benötigt weitaus weniger Versuchstiere und Materialien wodurch sie für eine explorative Analyse geeigneter erscheint. Durch die Nutzung der Bulbi der Versuchstiere aus den in Vivo Versuchen für die Immunhistochemie konnte eine effektive Nutzung der Versuchstierressourcen gewährleistet werden. Die mehrmalige Nutzung der Versuchstiere für verschiedene Versuche birgt allerdings auch die Gefahr eines statistischen Fehlers.

Durch die hier vorgenommenen Versuche wurden Angriffspunkte für gezielte weiterführende Analysen ermittelt. Die immunhistochemischen Versuche waren demnach durchaus geeignet, die Forschungsfragen zu beantworten und generelle Zusammenhänge zwischen dem RAAS und der BRS sowie der Angiogenese darzustellen. Aus den Ergebnissen der Fluoreszenzfärbungen können und sollten nun weitere quantitative Versuche abgeleitet werden, um die hier dargestellten Einflüsse von Aldosteron und Spironolacton mit den oben genannten Methoden zu verifizieren.

Lipophile Moleküle passieren die BRS leichter als hydrophile Moleküle (18). Durch die Lipophilität der Substanzen Aldosteron und Spironolacton wurde von einer guten Passage der Blut-Retina-Schranke und damit von einer hohen Bioverfügbarkeit in der Retina und im Laserherd ausgegangen. Versuche an der Blut-Hirn-Schranke, welche der BRS in vielen

Aspekten entspricht, zeigten jedoch eine im Vergleich zu anderen Steroidhormonen stark reduzierte Penetration der Blut-Hirn-Schranke durch Aldosteron (134). Dies gilt für die gesamten In-Vivo-Versuche. Allerdings ist durch die Laserbehandlung im Bereich des Laserherdes die BRS ohnehin beschädigt, sodass dies in diesem Versuchsansatz keinen Einfluss gehabt haben dürfte. Dieser Umstand könnte gerade im Gegenteil auch zu einer gezielten Wirkung an Stellen mit geschwächter BRS führen, welches für die Anwendung der Therapie von Vorteil sein könnte.

4.3 Einfluss auf Angiogenese und oxidativen Stress

4.3.1 Proliferationsverhalten von Endothelzellen

Ein Einfluss von Aldosteron und Spironolacton auf das Proliferationsverhalten von retinalen Endothelzellen ist für Rinder-Endothelzellen bereits nachgewiesen worden (177).

In dieser Studie wollten wir diese Ergebnisse auf humane Retinaendothelzellen übertragen und verwendeten analoge Konzentrationen zu Wilkinson-Berka.

Der dort beobachtete proproliferative Effekt von Aldosteron (177) konnte an den hREZ nicht nachgewiesen werden.

Die einzigen signifikanten Veränderungen traten nach 72 Stunden in der Population der vitalen Zellen und nach 48 Stunden in Bezug auf die avitalen Zellen auf. Nach 48 Stunden Inkubation mit den verschiedenen Konzentrationen von Aldosteron und Spironolacton zeigte eine mittlere Konzentration von Aldosteron signifikant weniger und eine mittlere Konzentration von Spironolacton signifikant mehr tote Zellen als die Kontrolle. Dieser Effekt wurde weder nach 72 Stunden noch für andere Konzentrationen der Substanzen bestätigt.

Nach 72 Stunden zeigten die geringste Aldosteronkonzentration sowie eine mittlere Spironolactonkonzentration eine signifikant höhere Zahl vitaler Zellen als die Kontrolle. Auch dieses Ergebnis spiegelte sich nicht in den Zellzahlen der übrigen Konzentrationen. Demnach handelt es sich um einzelne, nicht der bekannten antagonistischen Wirkweise entsprechende Ergebnisse, die keinen Rückschluss auf eine Wirkung von Aldosteron und Spironolacton auf die Proliferation von hREZ zulassen.

Die gesamte Zellzahl, genauso wie die Proliferationszyklen, zeigten für keinen Zeitpunkt und keine Konzentration signifikante oder konsistente Unterschiede. Damit konnte ein Einfluss von Aldosteron und Spironolacton auf die Angiogenese über Beeinflussung der von Endothelzellen nicht nachgewiesen werden.

Daraus könnte geschlossen werden, dass das RAAS bzw. Aldosteron in dieser Hinsicht keine Rolle für die Angiogenese spielt.

Diese Wirkung wurde international jedoch bereits mehrmals beschrieben. Aldosteron wirkt beispielsweise proliferativ auf kardiale und retinale Endothelzellen (79, 177).

Allerdings wurden auch Endothelzellen, wie Aortenendothelzellen von Ratten, gefunden welche keine MR-Rezeptoren aufweisen. Dort wird die Aldosteronwirkung auf beispielsweise die proapoptotische Wirkung über andere Signalwege wie GPR30 vermittelt (81).

Weder die proapoptotische noch die proliferative Wirkung von Aldosteron oder der antagonistische Effekt durch Spironolacton konnte in dieser in-vitro Studie mit belastbaren Ergebnissen bestätigt werden. Aldosteron und Spironolacton beeinflussen die in vitro Proliferation von kultivierten Retinaendothelzellen nicht.

4.3.2 VEGF und Isolektin

Die Isolektin B4 (IB4) Färbung zeigte sich besonders stark an Gefäßen der CNV, der Choroidea und der Retina. Dies erklärt sich durch die Bildung von IB4 an Endothelzellen von nicht-Primaten. Des Weiteren markiert IB4 unmyelinisierte, primär afferente Neurone und die RET Rezeptor Tyrosin Kinase von Mikroglia (22, 171). Mikroglia wurden ebenfalls in der inneren Körnerschicht und im Bereich der CNV gefunden.

Besonders stark war die IB 4 Färbung im Bereich der CNV des Laserherdes. Dabei handelte es sich hauptsächlich um die Färbung der neovaskulären Gefäße. Auch wenn im LH vorhandene Mikroglia ebenfalls durch IB4 angefärbt werden lassen sich diese durch ihre oberflächliche Lage an neuen Gefäßen und Morphologie gut abgrenzen. Immunhistologische Färbung mit IB4 ist eine international etablierte Methode zur Beurteilung der laserinduzierten Neovaskularisation (30).

Nach drei Tagen konnte kein Einfluss von Aldosteron und Spironolacton nachgewiesen werden. Vierzehn Tage Behandlung mit Aldosteron erhöhten allerdings die Fluoreszenzintensität der IB 4 Färbungen, vierzehn Tage Behandlung mit Spironolacton verminderte sie. Dies bestätigt die angenommene proangiogene Wirkung von Aldosteron mit Verstärkung der choroidalen Gefäßneubildung im Laserherd und gleichzeitig die Umkehrung dieses Effektes durch die antiangiogene Wirkung von Spironolacton auf die CNV. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit dem Einfluss von Aldosteron und Spironolacton auf die klinische Ausprägung der CNV im OCT nach vierzehn Tagen. Durch längerfristigen Einfluss von Aldosteron wird demnach die CNV verstärkt und Spironolacton verringert sie.

Ebenfalls könnte es einen immunologischen Effekt der Substanzen auf die IB4 positiven Mikroglia zeigen. Eine proinflammatorische Wirkung auf Makrophagen und Mikroglia über die Aktivierung des MR, welche durch antagonistische Wirkung, z.B. Spironolacton aufgehoben werden kann wurde bereits in der Literatur beschrieben (34).

Andere Quellen wie Gallina et al berichten hingegen, dass Aldosteron auf die Reaktivität von Mikroglia der Retina keinen Effekt habe, während die Aktivität über Glucocorticoide und Müller Zellen gesteuert würde (71). Daten über den Einfluss von Aldosteron auf Mikroglia im Rahmen der AMD sind noch nicht existent.

Es ist also anzunehmen, dass Aldosteron und Spironolacton die Isolektin B4 Expression am ehesten über einen Effekt auf die Ausprägung der CNV beeinflussen.

Für retinale Neovaskularisationen und zahlreiche proliferative retinale Erkrankungen ist bereits ein therapeutischer Effekt durch Aldosteronantagonismus am MR beschrieben (45). Auch die Involvierung anderer Teile des RAAS in die Entstehung von CNV ist wie bereits oben erwähnt schon nachgewiesen worden (128, 152). Hier wird erstmals der Einfluss von Aldosteron und MR-Antagonismus auf ein Modell der CNV bei AMD und laserinduzierte CNV beschrieben. Aldosteron wirkt auf Neovaskularisationen proangiogen, Spironolacton antiangiogen.

Einer der wichtigsten Mediatoren der Angiogenese im Allgemeinen und choroidaler Neovaskularisationen im Speziellen ist VEGF. Ein Einfluss auf Expression oder Wirkung von VEGF stellt also immer auch einen großen Einfluss auf die Angiogenese dar. Die Entstehung neovaskulärer Gefäße im reifen Erwachsenen lässt sich der Angiogenese zuordnen (12, 99, 157).

VEGF wurde in den immunhistochemischen Färbungen in der gesamten Retina exprimiert. Besonders stark zeigte sich VEGF in der Ganglienzellschicht, dem RPE, im Choroid, im Bereich des LH und etwas geringer in der inneren und äußeren Körnerschicht.

Dies deckt sich mit den in der Literatur erwähnten VEGF-produzierenden Zellen der Retina. VEGF kann in der Retina von Müller-Zellen, Makrophagen, RPE-Zellen und in den Zellen der inneren und äußeren Körnerschicht sowie der Ganglienschicht produziert werden (27, 84, 136). In der normalen unbehandelten Retina wird VEGF hauptsächlich von der Ganglienzellschicht, der inneren Körnerschicht sowie dem RPE exprimiert. In den retinalen und choroidalen Gefäßen wird es physiologischer Weise nicht exprimiert. Im Rahmen der laserinduzierten CNV kommt es zur VEGF-Expression in choroidalen, nicht aber in retinalen Gefäßen. Makrophagen in CNV Nähe produzierten für einen Zeitraum von drei Wochen post Laser VEGF. Im subretinalen fibrovaskulären Gewebe konnte allerdings immer noch VEGF nachgewiesen werden (183).

Die höchste VEGF Produktion im Laserherd wird von Makrophagen erzeugt, mit Punctum maximum um den dritten Tag nach Laserinduktion der CNV (99).

Im LH konnte in dieser Studie eine Erhöhung der VEGF-Expression im Laserherd nach drei Tagen durch Aldosteron nachgewiesen werden. Entsprechend seiner antagonistischen Wirkung verminderte Spironolacton diese nach drei Tagen. Nach langfristiger vierzehntägiger Aldosteron- bzw. Spironolactongabe konnte dieser Effekt nicht mehr nachgewiesen werden.

Dies kann durch die Dynamik der VEGF-Expression im Modell der laserinduzierten CNV erklärt werden. Drei Tage nach Laserbehandlung kommt es zu einer starken VEGF- Expression in der gesamten Retina und insbesondere auch in choroidalen Gefäßen. Besonders starke VEGF-Expression findet sich am Laserherd und in LH-assoziierten choroidalen Gefäßen (183). Auch die VEGF Expression der Makrophagen ist an Tag drei auf ihrem Höhepunkt, sodass auch ein Einfluss auf die VEGF Expression der Makrophagen ursächlich sein kann (99).

Im Laufe der nachfolgenden Wochen nimmt die VEGF-Expression in der Retina stetig ab (183). Daher ist der Einfluss auf die VEGF-Expression nach drei Tagen besonders deutlich sichtbar. Aldosteron fördert die VEGF-Produktion und erhöht damit die Expression zum Zeitpunkt des Peaks, während Spironolacton die VEGF-Expression und damit den Peak abschwächt.

Vierzehn Tage nach der Laserinduktion sind die VEGF Level wahrscheinlich insgesamt bereits soweit abgesunken, dass der Effekt nicht mehr deutlich in der Immunhistochemie nachgewiesen werden kann. Da VEGF-Level in der CNV der AMD und anderen retinalen Erkrankungen jedoch auch langfristig erhöht sind (168), könnte eine Therapie mit Aldosteronantagonisten dort auch langfristige Wirkungen erzielen.

Die verstärkende Wirkung von Aldosteron auf die VEGF-Expression durch MR-Aktivierung wurde schon für andere Gewebe, wie beispielsweise die Niere, gezeigt (103). Hier wird bestätigt, dass diese Wirkung auch im Rahmen der choroidalen Neovaskularisation besteht und eine Antagonisierung durch Spironolacton möglich ist.

Die proangiogene Wirkung von Aldosteron konnte mithilfe dieser Methoden nachgewiesen und auf eine Beeinflussung der VEGF-Expression zurückgeführt werden. Spironolacton wirkt dabei als Antagonist.

Wie bereits oben erläutert nehmen Aldosteron und Spironolacton über die VEGF-Expression ebenfalls Einfluss auf die BRS.

4.3.3 Einfluss von H₂O₂ und Aldosteron/Spirolacton auf Endothelzellen

Wir konnten zeigen, dass oxidativer Stress durch H₂O₂ antiproliferativ auf Endothelzellen wirkt. Gleichzeitig konnte ein toxischer Effekt ausgeschlossen werden, da keine Konzentration H₂O₂ die Menge an toten Zellen beeinflusste. Damit handelt es sich um ein optimales Modell welches auch bereits für andere Endothelzellen verwendet wird (112).

Wie bereits eingangs erwähnt spielt oxidativer Stress in der Pathogenese der CNV bei AMD eine mannigfaltige Rolle. Dieses Modell ist hervorragend dafür geeignet zu untersuchen, ob Aldosteron oder Spirolacton den Effekt des oxidativen Stresses auf Endothelzellen verstärken oder sie davor schützen und damit Einfluss auf die CNV nehmen könnten.

Nur die geringere von zwei Aldosteronkonzentrationen konnte die Gesamtzellzahl der oxidativ gestressten Zellen vergrößern und sie somit gegen den Einfluss des oxidativen Stresses schützen.

Ein Einfluss auf die Endothelzellproliferation unter oxidativem Stress durch Aldosteron konnte aufgrund der Singularität der Signifikanz nicht nachgewiesen, kann aber aufgrund der Ergebnisse doch vermutet werden. Ein antiproliferativer Effekt von Spirolacton auf die Zellen unter oxidativem Stress konnte nach 48 h ebenfalls nachgewiesen werden.

Die proliferative Wirkung von Aldosteron auf Endothelzellen, beispielsweise kardiale Endothelzellen ist bereits mehrfach beschrieben worden (79) und entspricht demnach unseren Ergebnissen.

In der Literatur ist jedoch auch mehrfach eine Induktion von oxidativem Stress am Herzen und anderen Geweben durch Aldosteron beschrieben worden (164). Gleichzeitig zeigte die Inhibition des RAAS in vielen Studien einen protektiven Effekt auf die Funktionalität Endothelzellen (178).

Es ist also anzunehmen, dass Aldosteron unter oxidativem Stress weiterhin proliferativ auf die Endothelzellen wirkt, während in vivo die Funktionalität der Endothelzellen sowie der oxidative Stress im Gewebe weiter verstärkt werden. Die Kombination aus oxidativem Stress, endothelialer Dysfunktion sowie endothelialer Proliferation entspricht dem pathophysiologischen Milieu der exsudativen AMD. Dass dies der Aldosteronwirkung entspricht weist zusätzlich darauf hin, dass die Wirkung von Aldosteron in die pathophysiologischen Theorien und damit auch seine Antagonisierung in die Therapieansätze inkludiert werden sollte.

Alle signifikanten Effekte traten ausschließlich nach 48 Stunden auf, sodass es sich um die Wirkung eines eher langfristigen Einflusses handelt. Signalwege, welche ihre Wirkung meist erst nach einiger Zeit entfalten sind beispielsweise Signalwege, die die Genexpression oder –transkription beeinflussen.

Oxidativer Stress fördert bekanntermaßen die Ausbildung okulärer Neovaskularisationen und im besonderen Maße auch CNV über eine Vielzahl von Mechanismen (50). Und auch der verstärkende Effekt des RAAS auf die pathologische Wirkung des oxidativen Stresses ist bereits für Angiotensin II bekannt (176).

Der Einfluss von Aldosteron und Spironolacton auf oxidativen Stress in der Retina kann mithilfe der Ergebnisse dieser Methode nicht hinreichend erklärt werden. Dazu müssen weitere Versuche folgen um den Einfluss auf den oxidativen Stress in der Retina in vivo sowie die einzelnen Komponenten der Retina, welche oxidativem Stress ausgesetzt sind oder ihn produzieren, zu ergründen.

Die proangiogene Wirkung von Aldosteron und antiangiogene Wirkung von Spironolacton auf Endothelzellen, welche wie in der CNV oxidativem Stress ausgesetzt sind, konnte hier dargestellt werden.

4.3.4 Zusammenfassende Einordnung

Die Frage nach der proangiogenen Wirkung Aldosterons kann durch diese Ergebnisse eindeutig beantwortet werden. Aldosteron wirkt durch Erhöhung von VEGF proangiogen, während Spironolacton durch Hemmung der VEGF-Expression angiogene Prozesse beeinträchtigt.

Des Weiteren hemmt Spironolacton in vitro die Proliferation von Endothelzellen unter oxidativem Stress, wirkt also antiangiogen. Inwiefern sich diese Eigenschaft in vivo widerspiegelt konnte nicht abschließend geklärt werden.

Überraschenderweise konnte der Verdacht auf eine weitere proangiogene Wirkung des Aldosterons gestellt werden. Aldosteron fördert über den MR (da durch Spironolacton antagonisiert) vimentinpositive Zellen im Laserherd, bei denen es sich nach aktueller Datenlage um endotheliale Vorläuferzellen (endothelial progenitor cells – EPCs) handelt.

Insgesamt hat Aldosteron also einen proangiogenen Effekt, Spironolacton wirkt antiangiogen.

4.3.5 Methodenkritik und mögliche Fehlerquellen

Für die immunhistochemischen Analysen der Proteinexpression gilt wie bereits oben erwähnt, dass die Methode zur Beantwortung der Frage nach pathophysiologischen Zusammenhängen zwischen Aldosteron- bzw. Spironolactonwirkung und der Angiogenese durchaus geeignet war. Die Ergebnisse müssen allerdings in weiterführenden Studien noch durch quantitative Analysen verifiziert werden.

Der Effekt auf retinale Endothelzellen konnte durch Kultivierung von hREZ isoliert beobachtet werden. FACS-Analysen von immunmarkierten Zellen erzeugen quantifizier- und belastbare Ergebnisse. Durch eine Titration der Aldosteron- und Spironolactonkonzentrationen hätte eine konzentrationsabhängige Wirkung sichtbar gemacht werden können. Eine Beeinflussung der Proliferation durch andere Pathomechanismen ist im Gegensatz zu *in vivo* Versuchen ausgeschlossen. Es handelt sich demnach um eine optimale Methode, um den Effekt von Aktivierung oder Inhibierung des MR auf die Endothelzellen zu analysieren. Die Inkubation von Endothelzellen in Zellkultur mit Wasserstoffperoxid wird international als Modell des oxidativen Stresses anerkannt und damit optimal geeignet die Wirkung von Aldosteron und Spironolacton auf oxidativen Stress in Bezug auf die Endothelzellen zu untersuchen (158). Da die Angiogenese, die Endothelzellproliferation und auch der oxidative Stress in Organismen ein multifaktorielles Geschehen ist und durch eine Vielzahl von beteiligten Signalwegen und Zellpopulationen auch eine indirekte Wirkung des Aldosterons möglich ist, kann diese Methode nur ein eingeschränktes Bild des Effektes wiedergeben.

Eine mögliche Fehlerquelle ist auch die Beeinflussung der Zellen durch die Kultivierung. Durch die Überführung aus humanen Retinae in die Zellkultur kann es zu Veränderungen der Zelleigenschaften gekommen sein. Dies ist allerdings ein allgemeines Problem von *in vitro* Versuchen. Zur Bestätigung der methodischen Korrektheit der Ergebnisse wäre eine Identifizierung des MR an den Zellen wünschenswert. Auch eine im Verlauf mangelhafte Proliferationssteigerung durch VEGF wirft Fragen nach der Eignung der hier verwendeten hREZ zur Proliferationsanalyse auf. Eventuell wurden die proliferativen Eigenschaften durch die Kultivierung beeinträchtigt. Dass eine Modifikation des Proliferationsverhaltens der Zellen dennoch möglich ist, zeigt allerdings die Reaktion auf oxidativen Stress. Möglicherweise proliferieren die Zellen durch die guten *in vitro* Bedingungen bereits zu stark, um einen signifikanten Anstieg nach Stimulierung zu leisten.

4.4 Zusammenfassung und Fazit – Wie wirkt das RAAS bei choroidaler Neovaskularisation?

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass Aldosteron eine nicht zu vernachlässigende Wirkung auf verschiedene pathophysiologische Bereiche der Altersbedingten Makuladegeneration hat. Aldosteron wird in der Literatur als Verstärker des oxidativen Stresses beschrieben, allerdings wirkt Aldosteron bei Endothelzellen unter Einfluss des oxidativen Stresses proproliferativ und schwächt die antiproliferative Wirkung der ROS ab. Die proangiogene Wirkung des Aldosterons wird ebenfalls durch eine verstärkte VEGF Expression deutlich. Diese wird wiederum durch Spironolacton geschwächt. Klinisch spiegelt sich die angiogene Wirkung in der verminderten CNV in der Spironolactongruppe im Vergleich zur Aldosterongruppe wieder. Auch die Größe der Laserherde wird dadurch beeinflusst. Aldosteron hat also eine proangiogene Wirkung, Spironolacton wirkt antiangiogen auf choroidale Neovaskularisationen.

Durch die Verringerung der Neovaskularisation ist zum Teil zu erklären, dass ebenfalls die zentrale Dicke der Retina im Laserherd unter Spironolacton abnimmt, bzw. unter Aldosteron zunimmt. Eine andere Erklärung wäre Beeinflussung der retinalen Ödembildung. Eine Wirkung von Aldosteron auf den transzellulären Stofftransport über AQP-4 und GLUT-1 konnte hier nicht nachgewiesen werden. Die fehlende Wirkung auf den transzellulären Wassertransport impliziert, dass die Beeinflussung retinaler Ödeme durch MR-Beeinflussung über parazelluläre Wege im Rahmen der BRS Modifikation stattfindet. Hier konnte eine Schwächung der Tight-Junctions über verminderte Claudin-5 Expression sowie der Adherens-Junctions über eine verminderte VE-Cadherin Expression durch Aldosteron nachgewiesen werden. Durch die daraus resultierende verstärkte Permeabilität der BRS wird retinale Ödembildung verstärkt. Ein gegenläufiger Effekt auf Claudin-5 und VE-Cadherin durch Spironolacton konnte nicht nachgewiesen werden. Es ist aber zu vermuten, dass Spironolacton den Aldosteron-Effekt ausgleichen könnte. Klinisch führte Spironolacton entsprechend des Antagonismus zu einer Verminderung der zentralen Dicke im LH, während Aldosteron diese erhöhte. Aldosteron wirkt also permeabilitätsfördernd auf die BRS durch Beeinflussung des transzellulären Wassertransportes und begünstigt die Entstehung retinaler Ödeme. Spironolacton verringert die Bildung retinaler Ödeme, möglicherweise durch die Aufhebung der permeabilitätsfördernden Wirkung des Mineralokortikoids auf die Tight und Adherens-Junctions der BRS.

Einen Überblick bietet Abbildung 50.

Dies bedeutet, dass Aldosteronantagonismus ein mögliches neues Therapieregime zur Behandlung der Altersbedingten Makuladegeneration darstellt und die Quantifizierung der hier erbrachten Ergebnisse als nächster Schritt erfolgen sollte um die klinische Relevanz nachzuweisen.

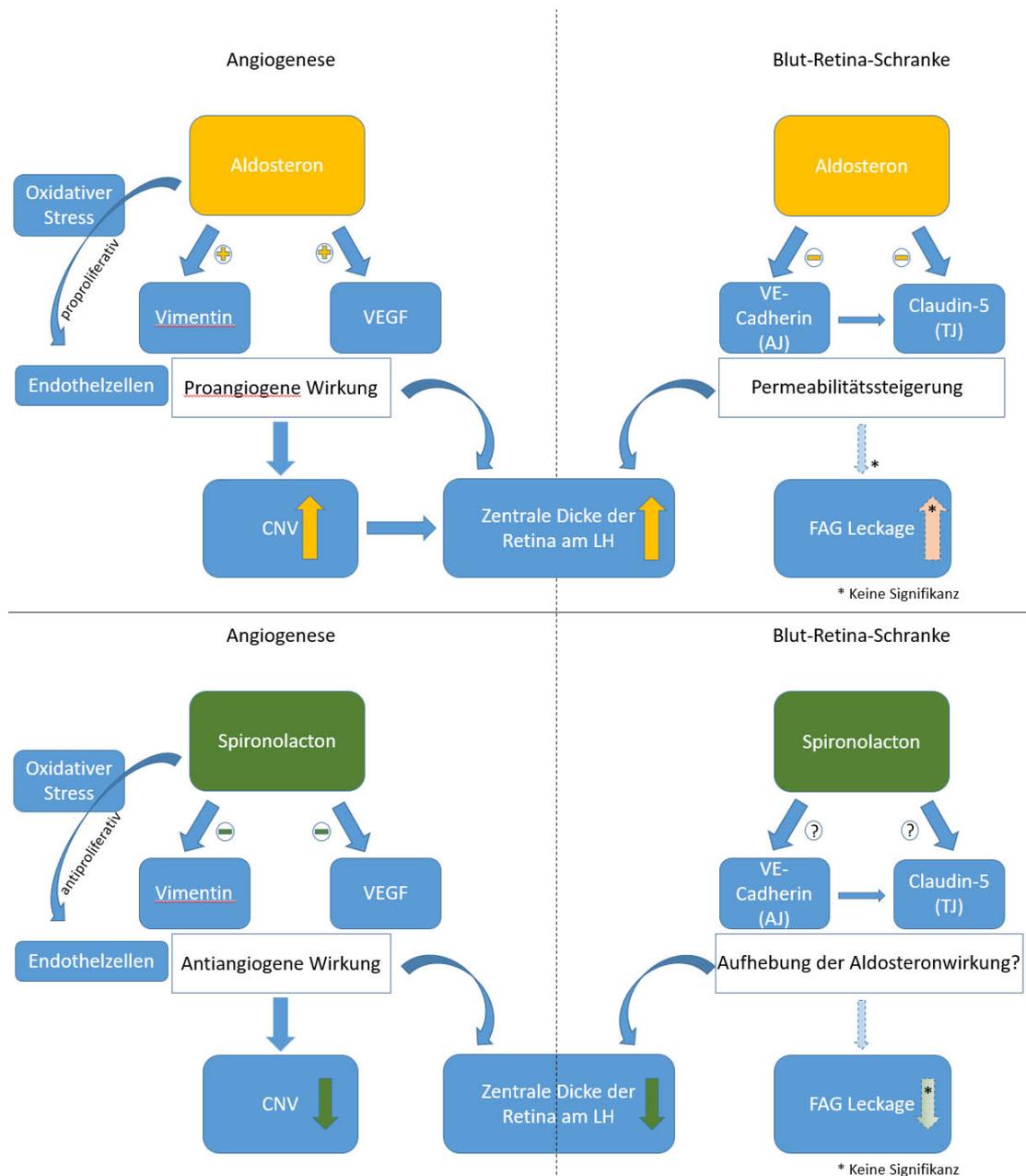


Abbildung 50 Zusammenfassung

4.5 Neue Therapiemöglichkeiten durch MR-Antagonismus

Aufgrund der hier erbrachten Forschungsergebnisse und der Einordnung in den gesamtwissenschaftlichen Kontext kann davon ausgegangen werden, dass MR Antagonismus

eine gute Kombinationsmöglichkeit zu den etablierten Therapien darstellen könnte. Auch Non-Responder der VEGF-Therapie könnten eventuell von dem anderen pathophysiologischen Ansatz dieser Therapiealternative profitieren.

Zumindest Patienten bei denen ein Hyperaldosteronismus festgestellt wurde sollten im Hinblick auf retinale Erkrankungen besonders in den Fokus der Therapiemöglichkeiten mit MR-Antagonisten gerückt werden. Ebenfalls könnte erwogen werden, im Falle einer Therapieresistenz endokrinologische Untersuchungen bzgl. des RAAS durchzuführen.

Bei den MR-Antagonisten Spironolacton und Eplerenon handelt es sich um erprobte und sichere Medikamente bei denen bereits langfristige Einnahmeverläufe über lange Zeiträume im Rahmen von kardiovaskulären Erkrankungen beobachtet wurden. Neben einem moderaten Nebenwirkungsprofil konnte sogar eine Mortalitätsreduktion festgestellt werden (140). Die bereits angewendeten Dosierungen wurden schon für retinale Erkrankungen angewendet und erscheinen ausreichend um Effekte zu erwirken (17).

Da viele der hier dargestellten Einflüsse des Aldosterons bzw. des Spironolactons langfristig erst nach vierzehn Tagen nachweisbar waren, ist davon auszugehen, dass eine Therapie der AMD mit Aldosteronantagonisten im Rahmen einer kontinuierlichen Langzeittherapie stattfinden sollte.

Andere Teile des RAAS werden bereits therapeutisch in der Augenheilkunde eingesetzt. Der positive Effekt von Angiotensin II Inhibition zur Reduktion choroidaler Neovaskularisationen in verschiedenen ophthalmologischen Erkrankungen konnte bereits nachgewiesen werden (119), genauso wie ein langanhaltender positiver Effekt auf den Krankheitsverlauf der chronischen serösen Retinopathie (188).

4.6 Weiterer Forschungsbedarf

Die hier immunhistochemisch erbrachten Ergebnisse müssen in folgenden Studien durch quantitative Methoden wie RT-PCR oder Western Blot Analysen verifiziert werden.

Zudem sollte versucht werden die hier durch Aldosteron ausgelösten Effekte direkt durch simultane Gabe von Spironolacton zu revidieren. Damit würde sowohl der Signalweg über den MR als auch die Eignung des MR-Antagonismus als Therapieoption bestätigt.

Der Einfluss des RAAS auf den wichtigen pathophysiologischen Faktor der Inflammation wurde in dieser Arbeit vernachlässigt. An die hier genutzte Methodik angelehnt sollte auch die Involvierung von Mikroglia beleuchtet werden, zum Beispiel durch Autofluoreszenzaufnahmen an CX3CR1-Mausmodellen (2).

Mangelhaft beantwortet ist auch die Frage nach dem Einfluss von Aldosteron und Spironolacton auf den oxidativen Stress. In vivo Versuche nach dem Einfluss auf die Produktion von ROS durch Oxidasen oder auf Antioxidationsmechanismen könnten Licht in das Dunkel bringen.

Die Eigenschaften der humanen Retinaendothelzellen könnten durch Nachweis des MR-Rezeptors oder Proliferationsstudien mit Aldosteron und VEGF weitere Erkenntnisse und Interpretationsmöglichkeiten der bereits erzielten Ergebnisse liefern.

Auch klinische Beobachtungen retinaler Erkrankungen von Patienten mit systemischem Hyperaldosteronismus könnten wichtige Hinweise geben.

Die Komplexe Pathologie der CNV wird bei weiterer Erforschung noch viele weitere Angriffsmöglichkeiten für Therapieansätze bieten.

5 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 Die Anatomie des Auges (80)	1
Abbildung 2 Links: Schematischer Aufbau der Retina (80), Rechts: Gefäßversorgung der Retina (29)	3
Abbildung 3 Retina, Lamina vitrea und Choroidea (80).....	4
Abbildung 4 Tight Junction und Adherens Junction (35)	10
Abbildung 5 CNV Typ I (oben) und CNV Typ II (unten) (82).....	16
Abbildung 6 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (74).....	23
Abbildung 7 HE-gefärbter LH mit durchbrochener Bruchschen Membran.....	29
Abbildung 8 subkutane Injektion in die Nackenfalte	31
Abbildung 9 Intraperitoneale Injektion	31
Abbildung 10 FAG der 4 LH eines Mausauges	32
Abbildung 11 OCT und histologischer Schnitt (HE-Färbung) durch die Maus-Retina	33
Abbildung 12 Maus vor dem Heidelberg Spectralis HRA-OCT (links), Infrarotbild und OCT (rechts).....	34
Abbildung 13 Auswertung der Fluoreszenzangiographie eines Laserherdes (Links: Infrarotbild, Mitte: FAG-Bild, Rechts: FAG-Bild mit umrandetem LH).....	36
Abbildung 14 Isoflurannarkose.....	38
Abbildung 15 Herstellung von Paraffinschnitten am Mikrotom.....	39
Abbildung 16 zentrale Retinadicke nach drei und vierzehn Tagen postLaser (days post laser – dpl) Die zentrale Retinadicke wird drei dpl durch Aldosteron signifikant (Man-Withney-U-Test $p=0,016$) erhöht. Die zentrale Retinadicke der Kontroll- und Spironolactongruppe bewegten sich auf ähnlichem Niveau mit gleichem Median.	48
Abbildung 17 Laserherde 14 dpl mit choroidaler Neovaskularisation Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten sich nach 14 Tagen nicht, es lässt sich aber eine Tendenz der zentralen Retinadicke mit Aldosteron>Kontrolle>Spironolacton darstellen. Auffällig ist die im Median verminderte Retinadicke in der Spironolactongruppe.....	49
Abbildung 18 Laserherddurchmesser 14 dpl.....	50
Abbildung 19 Zeitliche Dynamik der Laserherddurchmesser drei bis vierzehn dpl.....	51
Abbildung 20 CNV nach vierzehn Tagen	52
Abbildung 21 Laserherdgröße im Infrarotbild der FAG 3 und 14 dpl Auch in der Fluoreszenzangiographie konnte kein signifikanter Unterschied in der Laserherdgröße zum gleichen Zeitpunkt zwischen den Substanzgruppen nachgewiesen werden. Allerdings waren die Laserherde in der Spironolactongruppe die nach 14 Tagen untersucht wurde signifikant kleiner als in der nach 3 Tagen untersuchten Gruppe	54

Abbildung 22 MFI in der Frühphase der FAG 3 und 14 dpl In der Frühphase ist noch nicht die maximale Fluoreszenz der Angiographie erreicht. Hier zeigt sich eine tendenziell erhöhte Fluoreszenz in der Aldosterongruppe im Vergleich zu Kontrolle und Spironolactongruppe. Signifikante Unterschiede können jedoch nicht nachgewiesen werden.....	55
Abbildung 23 MFI in der Spätphase der FAG 3 und 14 dpl	56
Abbildung 24 Ausschnitt aus der Retina (Ganglienzellschicht, innere Körnerschicht) mit einzelnen IB4 (grün) gefärbten Zellen	59
Abbildung 25 IB4-Färbung von CNV in Laserherden 14 dpl (A-Aldosteron, B-Kontrolle, C-Spironolacton), 40 fache Vergrößerung. Verstärkte IB-4 Expression durch Aldosteron, verminderte IB-4 Expression durch Spironolacton).....	59
Abbildung 26 VEGF Expression in der Retina und unten im Bild der Choroidea, 20 fache Vergrößerung	60
Abbildung 27 VEGF-Expression im Laserherd mit CNV 3dpl (A-Aldosteron, B-Kontrolle, C-Spironolacton), 40-fache Vergrößerung. Aldosteron führt nach 3 Tagen zu einer erhöhten VEGF-Expression im Vergleich zur Kontrolle, während diese durch Spironolacton vermindert wird.	61
Abbildung 28 Claudin-5 Expression in der normalen Retina, 20fache Vergrößerung – vermehrte Expression in der Ganglienzellschicht, an Synapsen und Endothelzellen	62
Abbildung 29 Claudin5 (gefärbt mit Texas Red – TR - rot) -Expression in der Retina 14 dpl (A-Aldosteron, B-Kontrolle, C-Spironolacton), 10fache Vergrößerung Verminderte Claudin-5 Expression in der gesamten Retina nach 14 Tagen Aldosteroneinfluss.....	63
Abbildung 30 Claudin 5 (gefärbt mit Texas Red – TR - rot) A-Aldosteron, B-Kontroll, C-Spironolacton) oben 3 dpl, unten 14 dpl, 40 fache Vergrößerung Claudin 5 wird vermehrt im Laserherd exprimiert, im Vergleich zum umliegenden Gewebe der gleichen Schichten. Nach drei Tagen Aldosteronbehandlung konnte vereinzelt eine verringerte Claudin 5 Expression nachgewiesen werden. Nach 14 Tagen wurde reproduzierbar und konsistent eine verringerte Claudin 5 Expression von den unabhängigen, verblindeten Bewertern in der gesamten Retina, sowie im Laserherd beschrieben.	63
Abbildung 31 Claudin 5 (gefärbt mit Green Fluorescent Protein – GFP – grün) im Laserherd (A-Aldosteron, B-Kontrolle, C-Spironolacton) 14 dpl, 40 fache Vergrößerung 14 Tage nach Laserbehandlung zeigen die mit Aldosteron behandelten Laserherde eine reproduzierbar deutlich verminderte Expression von Claudin 5 im Vergleich zur Kontrolle und den mit Spironolacton behandelten Laserherden.	64
Abbildung 32 gefäßassoziierte ZO-1 Expression in LH und Retina, 20 fache Vergrößerung ZO-1 zeigt eine gefäßassoziierte Expression in Retina und Choroidea. Stark ist die Ausprägung in	

Ganglienzellschicht/innere Grenzmembran, äußerer plexiformen Schicht und im Stratum neuroepitheliale.	65
Abbildung 33 grün fluoreszierende Darstellung von ZO-1 in der CNV des Laserherdes (GFP) 14 dpl (A-Aldosteron, B-Kontrolle, C-Spironolacton). 40fache Vergrößerung Ein Effekt durch Aldosteron- oder Spironolacton konnte nicht nachgewiesen werden.	65
Abbildung 34 VE-Cadherin Expression in der Retina. 20fache Vergrößerung Die Expression ist besonders gefäßassoziiert in Retina und Choroidea sichtbar.	66
Abbildung 35 VE-Cadherin im LH (TR) 14 dpl (A-Aldosteron, B-Kontrolle, C-Spironolacton). 40fache Vergrößerung. VE Cadherin wird gefäßassoziiert, insbesondere im Bereich der CNV exprimiert. Am ausgeprägtesten ist die Expression nach Spironolactoneinfluss, am geringsten in der Aldosterongruppe.	66
Abbildung 36 Vimentin (TR - rot) und AQP 4 (GFP-grün) in der Retina. Simultane Expression in den Müllerzellen. 40fache Vergrößerung Alleinige Vimentinexpression kennzeichnet mesenchymale Zellen. Diese konnten auch im Laserherd nachgewiesen werden.	67
Abbildung 37 Vimentinexpression im Bereich der CNV Laserherd (TR) 3 dpl (A- Aldosteron, B- Kontrolle, C- Spironolacton), 40 fache Vergrößerung - Verstärkte Expression unter Aldosteroneinfluss (A), vermindert unter Spironolactongabe (C) im Vergleich zur Kontrolle..	68
Abbildung 38 Cofärbung Vimentin (Rot) und AQP 4 (grün) im Laserherd 3dpl, Kontrollgruppe, 60fache Vergrößerung, Vimentin ist hauptsächlich im Laserherd im Bereich der CNV exprimiert. Dort zeigt sich keine, bzw. zum Teil schwache Co-Färbung mit Aquaporin. Es handelt sich zu einem Großteil um mesenchymale Zellen. Aquaporin wird eher darüber im Übergang zur Retina exprimiert.	68
Abbildung 39 Links AQP 4 (GFP), rechts Vimentin (TR) unbehandelt, Foto des gleichen Abschnittes ohne LH, 20fache Vergrößerung, Pfeile weisen auf vertikale Ausläufer der Müllerzellen	69
Abbildung 40 AQP 4 (GFP-grün) und Vimentin (TR-rot) 3dpl (A-Aldosteron, B-Kontrolle, C-Spironolacton) 20fache Vergrößerung – ein deutlicher Unterschied der AQP-4 Expression konnte nicht gesehen werden. Die stärkste Expression findet sich oberhalb der CNV.....	69
Abbildung 41 GLUT-1 (GFP) in der normalen Retina, 20fache Vergrößerung. Hauptsächlichliche Expressionsorte sind die Ganglienzellschicht, die äußere plexiforme Schicht und äußere Körnerschicht.	70
Abbildung 42 GLUT (GFP) 14 dpl (A-Aldosteron, B-Kontrolle, C- Spironolacton) 40fache Vergrößerung – die Expression zeigte keine Veränderung durch Aldosteron oder Spironolacton.	70

- Abbildung 43 Vitale Zellen nach 72 h Die Anzahl der vitalen Zellen nach 72 Stunden wurde durch eine Aldosteronkonzentration von 100 pM sowie Spironolactonkonzentration von 2 mM signifikant erhöht. Die antizipierte antagonistische Wirkung der Stoffe konnte nicht nachgewiesen werden..... 72
- Abbildung 44 Tote Zellen nach 48 h Nach 48 h war die Anzahl der toten Zellen bei der Aldosteronkonzentration von 100 nM sowie 1 µM verringert. Das Aldosteron wirkte also protektiv auf die Endothelzellen. Die Anzahl der toten Zellen bei Behandlung mit 2 µM Spironolacton war dagegen signifikant erhöht. Für die übrigen Konzentrationen ließ sich dieser antagonistische Effekt nicht signifikant zeigen..... 73
- Abbildung 45 Proliferationszyklen über 48 Stunden (Zeitpunkt 24 h bis 72 h) Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Es zeigte sich also in dieser Untersuchung kein Einfluss der Substanzen auf die Proliferation unter normalen kulturellen Bedingungen. 74
- Abbildung 46 Titration - Oxidativer Stress durch Wasserstoffperoxid Der oxidative Stress durch das hinzugefügte Wasserstoffperoxid führte in jeder Konzentration und proportional zur Konzentration zu einer signifikanten Verminderung der Proliferation und damit der vitalen Zellen sowie zu einer signifikanten Reduzierung der Gesamtzellzahl. Eine Zunahme der avitalen Zellen zeigte sich hingegen nicht. Es wurde also die Proliferation gehemmt. 75
- Abbildung 47 Gesamtzellzahl nach 24 h Wasserstoffperoxid vermindert die Gesamtzellzahl durch Proliferationshemmung auch bei gleichzeitiger Zugabe der Substanzen Aldosteron und Spironolacton im Vergleich zur Gesamtzellzahl ohne Wasserstoffperoxid mit gleicher Substanzzugabe.. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Substanzgruppen konnte nach 24 h nicht nachgewiesen werden..... 77
- Abbildung 48 Einfluss auf die Gesamtzellzahl nach 48 h unter oxidativem Stress Signifikant verringert war die Gesamtzellzahl sowie die Zahl der vitalen Zellen von Spironolacton 1 µM mit 150 µg Wasserstoffperoxid im Vergleich zur Kontrolle mit 150 µg Wasserstoffperoxid. Für die geringere Spironolactonkonzentration zeigte sich nur eine signifikante Reduktion der vitalen Zellen. Für Aldosteronkonzentrationen konnte nur eine vereinzelte signifikante Veränderung dargestellt werden. Bei 100 µg Wasserstoffperoxidzusatz hatten 100 nM Aldosteron einen proliferativen Effekt. Es konnte also zum Teil ein signifikanter, antagonistischer Effekt nachgewiesen werden, der sich aber nicht in allen Konzentrationsverhältnissen reproduzieren ließ..... 78
- Abbildung 49 Einfluss auf vitale Zellen nach 48 h unter oxidativem Stress Für den Vergleich zwischen den Substanzgruppen bei Zugabe von 150 µg Wasserstoffperoxid konnte ein signifikanter Unterschied nach 48 h nachgewiesen werden. Spironolacton 1 µg führte sowohl

bei vitalen Zellen, als auch in der Gesamtzellzahl zu einer signifikanten Zellverminderung. Eine erhöhte Population toter Zellen konnte für diese Konzentrationen nicht signifikant nachgewiesen werden..... 80

Abbildung 50 Zusammenfassung..... 111

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Stadien der Altersbedingten Makuladegeneration (vgl. (15))	12
Tabelle 2 Empfohlene Nahrungsergänzungsmittel zur Verlangsamung der Progression einer intermediären oder fortgeschrittenen AMD nach Empfehlung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft Stand 2014 (46)	14
Tabelle 3 Für die zellbiologischen Versuche verwendete Substanzen und Konzentrationen	43
Tabelle 4 zentrale Retinadicke im LH in μm (Aldo = Aldosteron, Spiro = Spironolacton)	49
Tabelle 5 Deskriptive Statistik Volumen der CNV 14 dpl.....	53
Tabelle 6 Laserherdgröße in μm im Infrarotbild der FAG (Aldo = Aldosteron, Spiro = Spironolacton)	55
Tabelle 7 Kruskal-Wallis- und Man-Whitney-U Testergebnisse MFI (Aldo= Aldosteron, Spiro = Spironolacton)	57
Tabelle 8 Verhältnis MFI zu Pixelzahl	58
Tabelle 9 Kruskal-Wallis-Test: DMSO zu Kontrolle.....	71
Tabelle 10 Gesamtzellzahlen bei verschiedenen Wasserstoffperoxidkonzentrationen.....	76
Tabelle 11 Ergebnisse des Kruskal-Wallis und Man-Whitney U Testes	76
Tabelle 12 P-Werte MWU Test der Aldosteron/Spironolactonkonzentrationen mit H_2O_2 gegen die entsprechende H_2O_2 -Kontrolle Im Vergleich zwischen den Substanzgruppen bei gleicher Wasserstoffperoxidgabe konnte nach 24 h kein signifikanter Unterschied dargestellt werden. .	79
Tabelle 13 Zusammenfassung der Ergebnisse der optischen Kohärenztomographie	81
Tabelle 14 Zusammenfassung der Ergebnisse der Fluoreszenzangiographie	82
Tabelle 15 Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen	84
Tabelle 16 Zusammenfassung der Ergebnisse der zellbiologischen Versuche mit Retinaendothelzellen	86
Tabelle 17 Zusammenfassung der Ergebnisse der zellbiologischen Versuche unter oxidativem Stress	87
Tabelle 18 Geräte und Zubehör für das Mausmodell der laserinduzierten CNV und in Vivo Imaging	I
Tabelle 19 Lösungen, Reagenzien und Therapeutika	II
Tabelle 20 Verbrauchsartikel Mausmodell und In Vivo Imaging.....	III
Tabelle 21 Versuchsaufbau der Mausversuche	IV
Tabelle 21 Materialien Immunhistochemische Methoden	VI
Tabelle 23 Gewichtsadaptiertes Injektionsvolumen bei intraperitonealer Ketaminnarkose	VII
Tabelle 24 Antikörper	IX
Tabelle 25 Geräte Immunhistochemie	XI

Tabelle 26 Alkoholreihe Paraffineinbettung	XII
Tabelle 27 Entparaffinierung	XIII
Tabelle 28 Zelllinie, Zellkulturmedium und Zusätze	XIII
Tabelle 29 Lösung und Reagenzien für zellbiologische Methoden	XV
Tabelle 30 Geräte und Software für zellbiologische Methoden	XVI
Tabelle 31 Verbrauchsartikel für molekularbiologische Methoden	XVII
Tabelle 32 Parametereinstellung FACS-Gerät	XVIII

7 Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AJ	Adherens Junction
AK	Antikörper
AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
ANG I	Angiotensin I
ANG II	Angiotensin II
APC	Allophycocyanin
AQP	Aquaporin
AREDS	Age-Related Eye Disease Study
ATR 1	Angiotensin II Typ I Rezeptor
BRS	Blut-Retina-Schranke
BSA	Bovines Serum Albumin
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CNV	Choroidale Neovaskularisation
DAPI	Diamidin-2-phenylindol
DHAA	Dehydroabietic Acid
DMSO	Dimethyl-Sulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpl	days post laser
EnaC	Epithelial Natrium Channel
EPC	Endothelial Progenitor Cells
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FAG	Fluoreszenzangiographie
FR	Photorezeptoren
FSC	Forward Scatter
FZ	Fluoreszein
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GLUT	Glucose-Transporter
H2O2	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin

	human retinal endothelial cells / humane
hREC / hREZ	Retinaendothelzellen
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IB 4	Isolektin B4
ICG	Indocyangrün
JAM	Junktionale Adhäsions-Molekül
KCa	Kaliumkanal
KWT	Kruskal Wallis Test
LH	Laserherd
MAP-Kinase	Mitogen-Activated Protein
MCP	Monocyte-Chemoattractant-Protein
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
MR	Mineralocorticoid-Rezeptor
MWU	Man Whitney U Test
MZ	Müller Zellen
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
OCT	Optische Kohärenztomographie
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCV	Polypoidale Choroidale Vaskulopathie
PEA	Pigmentepithelabhebung
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PEDF	Pigment Epithelium Derived factor
PI3 Kinase	Phosphoinositid 3 Kinase
PIGF	Placental Growth Factor
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAP	Retinale Angiomatöse Proliferation
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPE	Retinales Pigmentepithel
RT-PCR	Real-Time Polymerase-Chain-Reaction
SD-OCT	Spectral-Domain-Optical Coherence Tomography
SSC	Sideward Scatter
TGF	Transforming Growth Factor
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase

TJ	Tight Junction
VE-Cadherin	Vascular Endothelial- Cadherin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR2	VEGF Rezeptor 2
ZO	Zonula Occludens
ZO-1	Zonula Occludens Protein 1
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZTE	Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung

8 Literaturverzeichnis

1. Ahn SJ, Park KH, Woo SJ. Subretinal fibrosis after antivascular endothelial growth factor therapy in eyes with myopic choroidal neovascularization. *Retina (Philadelphia, Pa.)* 2016 Nov; (36(11)):2140–9. doi: 10.1097/IAE.0000000000001043.
2. Alex AF, Cordes S., Höing C., Rohloff N., Eter N. Quantification of in-vivo imaging methods for visualization of retinal and choroidal vessel patterns, retinal structure and analysis of fluorescent cells in the mouse fundus. *Advances in Ophthalmology & Visual System* 2017; 2017(6(4)):110–27.
3. Alex AF, Heiduschka P, Eter N. Retinal fundus imaging in mouse models of retinal diseases. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2013; 935:41–67. doi: 10.1007/978-1-62703-080-9_3.
4. Alnawaiseh M, Rosentreter A, Hillmann A, Alex AF, Niekämper D, Heiduschka P, Pap T, Eter N. OCT angiography in the mouse: A novel evaluation method for vascular pathologies of the mouse retina. *Experimental Eye Research* 2016; 145:417–23. doi: 10.1016/j.exer.2016.02.012.
5. Amasheh S, Milatz S, Krug SM, Markov AG, Gunzel D, Amasheh M, Fromm M. Tight junction proteins as channel formers and barrier builders. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2009; 1165:211–9. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04439.x.
6. Antonetti DA, Barber AJ, La Hollinger, Wolpert EB, Gardner TW. Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *The Journal of biological chemistry* 1999; 274(33):23463–7.
7. Arndt-Jovin DJ, Jovin TM. Analysis and sorting of living cells according to deoxyribonucleic acid content. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 1977; 25(7):585–9.
8. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schattman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science (New York, N.Y.)* 1997; 275(5302):964–7.
9. Atlas SA. The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition. *Journal of Managed Care Pharmacy* 2007; 13(8 Supp B):9–20. doi: 10.18553/jmcp.2007.13.s8-b.9.

10. Aust G, Aumüller G, Kirsch J, Conrad A, Engele J. *Duale Reihe Anatomie*. 3. Auflage. Berlin: Thieme; 2014.
11. Ba J, Peng RS, Xu D, Li YH, Shi H, Wang Q, Yu J. Intravitreal anti-VEGF injections for treating wet age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Drug design, development and therapy* 2015; 9:5397–405. doi: 10.2147/DDDT.S86269.
12. Barakat MR, Kaiser PK. VEGF inhibitors for the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Expert opinion on investigational drugs* 2009; 18(5):637–46. doi: 10.1517/13543780902855316.
13. Berger A, Cavallero S, Dominguez E, Barbe P, Simonutti M, Sahel JA, Sennlaub F, Raoul W, Paques M, Bemelmans AP. Spectral-domain optical coherence tomography of the rodent eye: highlighting layers of the outer retina using signal averaging and comparison with histology. *PloS one* 2014; 9(5):e96494. doi: 10.1371/journal.pone.0096494.
14. Bermudez MA, Vicente AF, Romero MC, Arcos MD, Abalo JM, Gonzalez F. Time course of cataract development in anesthetized mice. *Current eye research* 2011; 36(3):278–84. doi: 10.3109/02713683.2010.542868.
15. Berufsverband der Augenärzte Deutschlands e.V. und Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft e.V. Leitlinie Nr. 21 Altersabhängige Makuladegeneration AMD; 2015.
16. Betz C, Lenard A, Belting H-G, Affolter M. Cell behaviors and dynamics during angiogenesis. *Development (Cambridge, England)* 2016; 143(13):2249–60. doi: 10.1242/dev.135616.
17. Bialasiewicz AA, Abdelhamid M, Shenoy R, Manish B. Long-term Resolution of Blinding Polypoidal Choroidal Vasculopathy with Recurrent Bilateral Central Involvement by Low-dose Oral Eplerenone Treatment. *Middle East African journal of ophthalmology* 2016; 23(2):225–8. doi: 10.4103/0974-9233.175894.
18. Bleeker GM, Maas EH. Penetration of penethamate, a penicillin ester, into the tissues of the eye. *American Medical Association - archives of ophthalmology* 1958; 60(6):1013–20.
19. Bobryshev YV, Cherian SM, Inder SJ, Lord RSA. Neovascular expression of VE-cadherin in human atherosclerotic arteries and its relation to intimal inflammation. *Cardiovascular research* 1999; 43(4):1003–17.
20. Bolte E, Verdy M, Marc-Aurele J, Brouillet J, Beauregard P, Genest J. Studies on New Diuretic Compounds: Spirolactone and Chlorothiazide. *Canadian Medical Association Journal* 1958; 79(11):881–8.

21. Bora PS, Sohn JH, Cruz JM, Jha P, Nishihori H, Wang Y, Kaliappan S, Kaplan HJ, Bora NS. Role of complement and complement membrane attack complex in laser-induced choroidal neovascularization. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2005; 174(1):491–7.
22. Boscia F, Esposito CL, Casamassa A, Franciscis V de, Annunziato L, Cerchia L. The isolectin IB4 binds RET receptor tyrosine kinase in microglia. *Journal of Neurochemistry* 2013; 126(4):428–36. doi: 10.1111/jnc.12209.
23. Bousquet E, Beydoun T, Rothschild PR, Bergin C, Zhao M, Batista R, Brandely ML, Couraud B, Farman N, Gaudric A, Chast F, Behar-Cohen F. Spironolactone for nonresolving central serous chorioretinopathy: a randomized controlled crossover study. *Retina (Philadelphia, Pa.)* 2015; 35(12):2505–15. doi: 10.1097/IAE.0000000000000614.
24. Brilla CG. Aldosterone and myocardial fibrosis in heart failure. *Herz* 2000; 25(3):299–306.
25. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in Retinal and Eye Research* 2006; 25(4):397–424. doi: 10.1016/j.preteyeres.2006.05.003.
26. Bringmann A, Uckermann O, Pannicke T, Iandiev I, Reichenbach A, Wiedemann P. Neuronal versus glial cell swelling in the ischaemic retina. *Acta Ophthalmologica* 2005; 83(5):528–38. Verfügbar unter: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0420.2005.00565.x/full>.
27. Brooks SE, Gu X, Kaufmann PM, Marcus DM, Caldwell RB. Modulation of VEGF production by pH and glucose in retinal Muller cells. *Current eye research* 1998; 17(9):875–82.
28. Campbell M, Nguyen ATH, Kiang AS, Tam LCS, Gobbo OL, Kerskens C, Dhuhghaill SN, Humphries MM, Farrar GJ, Kenna PF, Humphries P. An experimental platform for systemic drug delivery to the retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; 106(42):17817–22. doi: 10.1073/pnas.0908561106.
29. Campochiaro PA. Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases. *Progress in Retinal and Eye Research* 2015; 49:67–81. doi: 10.1016/j.preteyeres.2015.06.002.
30. Campos M, Amaral J, Becerra SP, Fariss RN. A Novel Imaging Technique for Experimental Choroidal Neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science* 20; 47(12):5163–70. doi: 10.1167/iovs.06-0156.

31. Casswell AG, Kohen D, Bird AC. Retinal pigment epithelial detachments in the elderly: classification and outcome. *The British Journal of Ophthalmology* 1985; 69(6):397–403.
32. Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; 99(20):12877–82. doi: 10.1073/pnas.162488599.
33. Chan-Ling T, Dahlstrom JE, Koina ME, McColm JR, Sterling R-A, Bean EG, Adamson S, Hughes S, Baxter LC. Evidence of hematopoietic differentiation, vasculogenesis and angiogenesis in the formation of human choroidal blood vessels. *Experimental Eye Research* 2011; 92(5):361–76. doi: 10.1016/j.exer.2011.02.009.
34. Chantong B, Kratschmar DV, Nashev LG, Balazs Z, Odermatt A. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors differentially regulate NF-kappaB activity and pro-inflammatory cytokine production in murine BV-2 microglial cells. *Journal of neuroinflammation* 2012; 9:260. doi: 10.1186/1742-2094-9-260.
35. Che X, Fan X-Q, Wang Z-L. Mechanism of blood-retinal barrier breakdown induced by HIV-1 (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine* 2014; 7(4):768–72.
36. Chong NH, Keonin J, Luthert PJ, Frennesson CI, Weingeist DM, Wolf RL, Mullins RF, Hageman GS. Decreased thickness and integrity of the macular elastic layer of Bruch's membrane correspond to the distribution of lesions associated with age-related macular degeneration. *The American journal of pathology* 2005; 166(1):241–51. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62248-1.
37. Constable IJ, Blumenkranz MS, Schwartz SD, Barone S, Lai CM, Rakoczy EP. Gene Therapy for Age-Related Macular Degeneration. *Asia-Pacific journal of ophthalmology (Philadelphia, Pa.)* 2016; 5(4):300–3. doi: 10.1097/APO.0000000000000222.
38. Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M, Lampugnani MG, Martin-Padura I, Stoppacciaro A, Ruco L, McDonald DM, Ward PA, Dejana E. Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96(17):9815–20.
39. Cruz A, DeFouw LM, DeFouw DO. Restrictive endothelial barrier function during normal angiogenesis in vivo: partial dependence on tyrosine dephosphorylation of beta-catenin. *Microvascular research* 2000; 59(2):195–203. doi: 10.1006/mvre.1999.2226.

40. Cunha-Vaz J. The blood-ocular barriers. *Survey of Ophthalmology* 1979; 23(5):279–96. doi: 10.1016/0039-6257(79)90158-9.
41. Cunha-Vaz JG. The blood–retinal barriers system. Basic concepts and clinical evaluation. Special issue in honour of David Maurice 2004; 78(3):715–21. doi: 10.1016/S0014-4835(03)00213-6.
42. Cunha-Vaz JG, Shakib M, Ashton N. Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. I. On the existence, development, and site of a blood-retinal barrier. *The British Journal of Ophthalmology* 1966; 50(8):441–53.
43. Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2004; 5(4):261–70. doi: 10.1038/nrm1357.
44. Deliyanti D, Armani R, Casely D, Figgett WA, Agrotis A, Wilkinson-Berka JL. Retinal Vasculopathy Is Reduced by Dietary Salt Restriction Involvement of Glia, ENaC α , and the Renin–Angiotensin–Aldosterone System. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2014; 34(9):2033–41. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303792.
45. Deliyanti D, Miller AG, Tan G, Binger KJ, Samson AL, Wilkinson-Berka JL. Neovascularization Is Attenuated With Aldosterone Synthase Inhibition in Rats With Retinopathy. *Hypertension* 2012; 59(3):607–13. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.188136.
46. Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft. Nahrungsergänzung bei AMD; 2014 [Stand: 13.01.2019]. Verfügbar unter: <http://www.dog.org/wp-content/uploads/2013/03/zue-Nahrungserg%C3%A4nzungsmitteln-bei-AMD-Oktober-2014.pdf>.
47. Dewerchin M, Carmeliet P. PlGF: A Multitasking Cytokine with Disease-Restricted Activity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2012; 2(8). doi: 10.1101/cshperspect.a011056.
48. Dithmar S, Holz FG. Fluoreszenzangiographie in Der Augenheilkunde: Fluoreszein-angiographie, Indozyaningrun-angiographie Und Fundus-autofluoreszenz. Dordrecht: Springer; 2006.
49. Dobi ET, Puliafito CA, Destro M. A new model of experimental choroidal neovascularization in the rat. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 1989; 107(2):264–9.

50. Dong A, Xie B, Shen J, Yoshida T, Yokoi K, Hackett SF, Campochiaro PA. Oxidative Stress Promotes Ocular Neovascularization. *Journal of cellular physiology* 2009; 219(3):544–52. doi: 10.1002/jcp.21698.
51. Duan Y, Mo J, Klein R, Scott IU, Lin HM, Caulfield J, Patel M, Liao D. Age-related macular degeneration is associated with incident myocardial infarction among elderly Americans. *Ophthalmology* 2007; 114(4):732–7. doi: 10.1016/j.ophtha.2006.07.045.
52. Eichler W, Yafai Y, Keller T, Wiedemann P, Reichenbach A. PEDF derived from glial Müller cells: a possible regulator of retinal angiogenesis. *Experimental Cell Research* 2004; 299(1):68–78. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.05.020.
53. Engel A, Fujiyoshi Y, Gonen T, Walz T. Junction-forming aquaporins. *Current Opinion in Structural Biology* 2008; 18(2):229–35. doi: 10.1016/j.sbi.2007.11.003.
54. Erdös EG, Skidgel RA. 7 - Metabolism of Bradykinin by Peptidases in Health and Disease A2 - Farmer, Stephen G. In: T1 - 7 - Metabolism of Bradykinin by Peptidases in Health and Disease A2 - Farmer, Stephen G, Hrsg. *The Kinin System : Handbook of Immunopharmacology*. London: Academic Press; 1997. S. 111–41.
55. Espinosa-Heidmann DG, Suner IJ, Hernandez EP, Monroy D, Csaky KG, Cousins SW. Macrophage Depletion Diminishes Lesion Size and Severity in Experimental Choroidal Neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science* 2003; 44(8):3586–92. doi: 10.1167/iovs.03-0038.
56. Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *Journal of cell science* 1998; 111 (Pt 13):1853–65.
57. Eter N, Bindewald-Wittich A. *Choroidale Neovaskularisation bei altersabhängiger Makuladegeneration*. 1. Aufl. Bremen: UNI-MED Verl.; 2007. (UNI-MED Science).
58. Fanestil DD. Mode of spiro lactone action: competitive inhibition of aldosterone binding to kidney mineralocorticoid receptors. *Biochemical pharmacology* 1968; 17(10):2240–2.
59. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *The Journal Of Cell Biology* 1963; 17:375–412.
60. Farquharson CA, Struthers AD. Spironolactone increases nitric oxide bioactivity, improves endothelial vasodilator dysfunction, and suppresses vascular angiotensin I/angiotensin II conversion in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2000; 101(6):594–7.

61. Fernandez-Robredo P, Moya D, Rodriguez JA, Garcia-Layana A. Vitamins C and e reduce retinal oxidative stress and nitric oxide metabolites and prevent ultrastructural alterations in porcine hypercholesterolemia. *Investigative ophthalmology & visual science* 2005; 46(4):1140–6. doi: 10.1167/iovs.04-0516.
62. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews* 2004; 25(4):581–611. doi: 10.1210/er.2003-0027.
63. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Seminars in oncology* 2002; 29(6 Suppl 16):10–4. doi: 10.1053/sonc.2002.37264.
64. Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nature medicine* 1998; 4(3):336–40.
65. Ferris FL3, Wilkinson CP, Bird A, Chakravarthy U, Chew E, Csaky K, Sarda SR. Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2013; 120(4):844–51. doi: 10.1016/j.opht.2012.10.036.
66. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408(6809):239–47. doi: 10.1038/35041687.
67. Ford KM, Saint-Geniez M, Walshe T, Zahr A, D'Amore PA. Expression and role of VEGF in the adult retinal pigment epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science* 2011; 52(13):9478–87. doi: 10.1167/iovs.11-8353.
68. Forstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2010; 459(6):923–39. doi: 10.1007/s00424-010-0808-2.
69. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *The Journal Of Cell Biology* 1993; 123(6 Pt 2):1777–88.
70. Gabrielian A, MacCumber MW. Central serous chorioretinopathy associated with the use of spironolactone, aldosterone receptor antagonist. *Retinal cases & brief reports* 2012; 6(4):393–5. doi: 10.1097/ICB.0b013e3182437db8.
71. Gallina D, Zelinka CP, Cebulla CM, Fischer AJ. Activation of glucocorticoid receptors in Muller glia is protective to retinal neurons and suppresses microglial reactivity. *Experimental neurology* 2015; 273:114–25. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.08.007.

72. Garweg JG. Makula-Atrophie bei feuchter altersabhängiger Makuladegeneration. *Der Ophthalmologe*:1–10. doi: 10.1007/s00347-016-0306-9.
73. Gasparo Md, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors. *Pharmacological Reviews* 2000; 52(3):415–72.
74. Gavard J, Gutkind JS. VE-cadherin and claudin-5: it takes two to tango. *Nature Cell Biology* 2008; 10(8):883–5. doi: 10.1038/ncb0808-883.
75. Gavard J, Gutkind JS. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nature Cell Biology* 2006; 8(11):1223–34. doi: 10.1038/ncb1486.
76. Georgiadis A, Tschernutter M, Bainbridge JWB, Balaggan KS, Mowat F, West EL, Munro PMG, Thrasher AJ, Matter K, Balda MS, Ali RR. The tight junction associated signalling proteins ZO-1 and ZONAB regulate retinal pigment epithelium homeostasis in mice. *PloS one* 2010; 5(12):e15730. doi: 10.1371/journal.pone.0015730.
77. Ghasemi FK, Nguyen QD. Adverse events and complications associated with intravitreal injection of anti-VEGF agents: a review of literature. *Eye* 2013; 27(7):787–94. doi: 10.1038/eye.2013.107.
78. Gottardi CJ, Gumbiner BM. Adhesion signaling: how beta-catenin interacts with its partners. *Current biology : CB* 2001; 11(19):4.
79. Gravez B, FTarjus A, Tarjus A, Pelloux V, Ouvrard-Pascaud A, Delcayre C, Samuel J, Clement K, Farman N, Jaisser F, Messaoudi S. Aldosterone promotes cardiac endothelial cell proliferation in vivo. *Journal of the American Heart Association* 2015; 4(1):e001266. doi: 10.1161/JAHA.114.001266.
80. Grehn F. *Augenheilkunde*. 31. Aufl. Berlin: Springer; 2012.
81. Gros R, Ding Q, Sklar LA, Prossnitz EE, Arterburn JB, Chorazyczewski J, Feldman RD. GPR30 Expression Is Required for the Mineralocorticoid Receptor–Independent Rapid Vascular Effects of Aldosterone. *Hypertension* 2011; 57(3):442–51. Verfügbar unter: <http://hyper.ahajournals.org/content/57/3/442.full>.
82. Grossniklaus H, Gass JD. Clinicopathologic correlations of surgically excised type 1 and type 2 submacular choroidal neovascular membranes. *American Journal of Ophthalmology* 1998; 126(1):59–69. doi: 10.1016/S0002-9394(98)00145-7.

83. Grossniklaus HE, Green WR. Choroidal neovascularization. *American Journal of Ophthalmology* 2004; 137(3):496–503. doi: 10.1016/j.ajo.2003.09.042.
84. Grossniklaus HE, Ling JX, Wallace TM, Dithmar S, Lawson DH, Cohen C, Elner VM, FElners SG, Elner SG, Sternberg P, JR. Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization. *Molecular vision* 2002; 8:119–26.
85. Hanschmann EM, Godoy, JR, Berndt C, Hudemann C, Lillig CH. Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins--molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling. *Antioxidants & redox signaling* 2013; 19(13):1539–605. doi: 10.1089/ars.2012.4599.
86. Harhaj NS, Felinski EA, Wolpert EB, Sundstrom JM, Gardner TW, Antonetti DA. VEGF activation of protein kinase C stimulates occludin phosphorylation and contributes to endothelial permeability. *Investigative ophthalmology & visual science* 2006; 47(11):5106–15. doi: 10.1167/iovs.06-0322.
87. Harhaj NS, Antonetti DA. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004; 36(7):1206–37. doi: 10.1016/j.biocel.2003.08.007.
88. Henschel A, Spital G, Lommatzsch A, Pauleikhoff D. Optical coherence tomography in neovascular age related macular degeneration compared to fluorescein angiography and visual acuity. *European journal of ophthalmology* 2009; 19(5):831–5.
89. Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, Hee MR, Flotte T, Gregory K, Puliafito CA. Optical coherence tomography. *Science (New York, N.Y.)* 1991; 254(5035):1178–81.
90. Huang LL, Nikolic-Paterson DJ, Ma FY, Tesch GH. Aldosterone induces kidney fibroblast proliferation via activation of growth factor receptors and PI3K/MAPK signalling. *Nephron. Experimental nephrology* 2012; 120(4):22. doi: 10.1159/000339500.
91. Ishibashi T, Hata Y, Yoshikawa H, Nakagawa K, FSueishi K, Sueishi K, FInomata H, Inomata H. Expression of vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularization. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 1997; 235(3):159–67.

92. Ishizaki E, Takai S, Ueki M, Maeno T, Maruichi M, Sugiyama T, Oku H, Ikeda T, Miyazaki M. Correlation between angiotensin-converting enzyme, vascular endothelial growth factor, and matrix metalloproteinase-9 in the vitreous of eyes with diabetic retinopathy. *American Journal of Ophthalmology* 2006; 141(1):129–34. doi: 10.1016/j.ajo.2005.08.066.
93. Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. Direct Binding of Three Tight Junction-Associated Maguks, Zo-1, Zo-2, and Zo-3, with the CooH Termini of Claudins. *The Journal Of Cell Biology* 1999; 147(6):1351–63.
94. Jiang F, Zhang G, Hashimoto I, Kumar BS, Bortolotto S, Morrison WA, Dusting GJ. Neovascularization in an arterio-venous loop-containing tissue engineering chamber: role of NADPH oxidase. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2008; 12(5b):2062–72. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00199.x.
95. Jia Y, Bailey ST, Wilson DJ, Tan O, Klein ML, Flaxel CJ, Potsaid B, Liu JJ, Lu CD, Kraus MF, Fujimoto JG, Huang D. Quantitative Optical Coherence Tomography Angiography of Choroidal Neovascularization in Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology* 2014; 121(7):1435–44. doi: 10.1016/j.ophtha.2014.01.034.
96. Kanski JJ. *Klinische Ophthalmologie*. 7. Aufl. München: Urban & Fischer in Elsevier; 2015.
97. Kirsch T, Beese M, Wyss K, Klinge U, Haller H, Haubitz M, Fiebeler A. Aldosterone Modulates Endothelial Permeability and Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity by Rearrangement of the Actin Cytoskeleton. *Hypertension* 2013; 61(2):501–8. Verfügbar unter: <http://hyper.ahajournals.org/content/61/2/501.full>.
98. Kornzweig AL. Changes in the choriocapillaris associated with senile macular degeneration. *Annals of ophthalmology* 1977; 9(6):753.
99. Krause TA, Alex AF, Engel DR, Kurts C Eter N. VEGF-Production by CCR2-Dependent Macrophages Contributes to Laser-Induced Choroidal Neovascularization. *PloS one* 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0094313.
100. Kronberg A HBL. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. *Methods in Enzymology* 1956; 1956.
101. Kumaramanickavel G. Age-Related Macular Degeneration: Genetics and Biology. *Asia-Pacific journal of ophthalmology (Philadelphia, Pa.)* 2016; 5(4):229–35. doi: 10.1097/APO.0000000000000223.

102. Kuroki M, Voest EE, Amano S, Beerepoot LV, Takashima S, Tolentino M, Kim RY, Rohan RM, Colby KA, Yeo KT, Adamis AP. Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Journal of Clinical Investigation* 1996; 98(7):1667–75.
103. Lai L, Pen A, Hu Y, Ma J, Chen J, Hao CM, Gu Y, Lin S. Aldosterone upregulates vascular endothelial growth factor expression in mouse cortical collecting duct epithelial cells through classic mineralocorticoid receptor. *Life sciences* 2007; 81(7):570–6. doi: 10.1016/j.lfs.2007.06.025.
104. Lampugnani MG, Orsenigo F, Gagliani MC, Tacchetti C, Dejana E. Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *The Journal Of Cell Biology* 2006; 174(4):593–604. doi: 10.1083/jcb.200602080.
105. Lampugnani MG, Zanetti A, Corada M, Takahashi T, Balconi G, Breviario F, Orsenigo F, Cattelino A, Kemler R, Daniel TO, Dejana E. Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, β -catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *The Journal Of Cell Biology* 2003; 161(4):793–804. Verfügbar unter: <http://jcb.rupress.org/content/161/4/793.full>.
106. Lampugnani MG, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G, Ruco LP, Dejana E. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *The Journal Of Cell Biology* 1992; 118(6):1511–22. doi: 10.1083/jcb.118.6.1511.
107. Leopold JA, Dam A, Maron BA, Scribner AW, Liao R, Handy DE, Stanton RC, Pitt B, Loscalzo J. Aldosterone impairs vascular reactivity by decreasing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Nature medicine* 2007; 13(2):189–97. doi: 10.1038/nm1545.
108. Lerche W. Zur Feinstruktur der Bruchschens Membran nach perforierenden Verletzungen, beim absoluten Glaukom und bei der Retinopathia diabetica. *Albrecht Von Graefes Archiv Für Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie* 1967; (173):78–96.
109. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246(4935):1306–9. doi: 10.1126/science.2479986.
110. Li H, Wang YS. An angiotensin-converting enzyme inhibitor modulates stromal-derived factor-1 through CD26/dipeptidyl peptidase IV to inhibit laser-induced choroidal neovascularization. *Molecular vision* 2013; 19:1107–21.

111. Li Q, Timmers AM, Hunter K, Gonzalez-Pola C, Lewin AS, Reitze DH, Hauswirth WW. Noninvasive imaging by optical coherence tomography to monitor retinal degeneration in the mouse. *Investigative ophthalmology & visual science* 2001; 42(12):2981–9.
112. Liu R, Liu H, Ha Y, Tilton RG, Zhang W. Oxidative Stress Induces Endothelial Cell Senescence via Downregulation of Sirt6. *BioMed Research International* 2014; 2014. doi: 10.1155/2014/902842.
113. Liu T, Hui L, Wang YS, Guo JQ, Li R, Su JB, Chen JK, Xin XM, Li WH. In-vivo investigation of laser-induced choroidal neovascularization in rat using spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT). *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie* 2013; 251(5):1293–301. doi: 10.1007/s00417-012-2185-3.
114. Lossinsky AS, Shivers RR. Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions. Review. *Histology & Histopathology* 2004 Apr; 19(2):535–64.
115. Lu L, Seidel CP, Iwase T, Stevens RK, Gong YY, Wang X, Hackett SF, Campochiaro PA. Suppression of GLUT1; a new strategy to prevent diabetic complications. *Journal of cellular physiology* 2013; 228(2):251–7. doi: 10.1002/jcp.24133.
116. Lüllmann H, Mohr K, Hein L. *Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen ; ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, der Pharmazie und der Biowissenschaften, eine Informationsquelle für Ärzte, Apotheker und Gesundheitspolitiker ; 129 Tabellen. 16. Aufl. Berlin: Thieme; 2006.*
117. Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *Journal of immunological methods* 1994; 171(1):131–7.
118. Mantych GJ, Hageman GS, Devaskar SU. Characterization of glucose transporter isoforms in the adult and developing human eye. *Endocrinology* 1993; 133(2):600–7. doi: 10.1210/endo.133.2.8344201.
119. Marin Garcia PJ, Marin-Castaño ME. Angiotensin II-related hypertension and eye diseases. *World Journal of Cardiology* 2014; 6(9):968–84. doi: 10.4330/wjc.v6.i9.968.
120. McLeod DS, Grebe R, Bhutto I, Merges C, Baba T, Luty GA. Relationship between RPE and choriocapillaris in age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science* 2009; 50(10):4982–91. doi: 10.1167/iovs.09-3639.

121. Metelitsina TI, Grunwald JE, DuPont JC, Ying G-S, Brucker AJ, Dunaief JL. Foveolar choroidal circulation and choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science* 2008; 49(1):358–63. doi: 10.1167/iovs.07-0526.
122. Michalska-Małecka K, Kabiesz A, Nowak M, Śpiewak D. Age related macular degeneration – challenge for future: Pathogenesis and new perspectives for the treatment. *European Geriatric Medicine* 2015; 6(1):69–75. doi: 10.1016/j.eurger.2014.09.007.
123. Michel F, Ambroisine M-L, Duriez M, Delcayre C, Levy BI, Silvestre J-S. Aldosterone Enhances Ischemia-Induced Neovascularization Through Angiotensin II-Dependent Pathway. *Circulation* 2004; 109(16):1933–7. doi: 10.1161/01.CIR.0000127112.36796.9B.
124. Moore DJ, Clover GM. The Effect of Age on the Macromolecular Permeability of Human Bruch's Membrane. *Investigative ophthalmology & visual science* 2001; 42(12):2970–5.
125. Moravski CJ, Kelly DJ, Cooper ME, Gilbert RE, Bertram JF, Shahinfar S, Skinner SL, Wilkinson-Berka JL. Retinal Neovascularization Is Prevented by Blockade of the Renin-Angiotensin System. *Hypertension* 2000; 36(6):1099–104. Verfügbar unter: <http://hyper.ahajournals.org/content/36/6/1099.full>.
126. Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *The Journal Of Cell Biology* 1999; 147(1):185–94.
127. Munk MR, Ceklic L, Ebnetter A, Huf W, Wolf S, Zinkernagel MS. Macular atrophy in patients with long-term anti-VEGF treatment for neovascular age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmologica* 2016. Verfügbar unter: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/aos.13157/full>.
128. Nagai N, Oike Y, Izumi-Nagai K, Urano T, Kubota Y, Noda K, Ozawa Y, Inoue M, Tsubota K, Suda T, Ishida S. Angiotensin II type 1 receptor-mediated inflammation is required for choroidal neovascularization. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2006; 26(10):2252–9. doi: 10.1161/01.ATV.0000240050.15321.fe.
129. Navaratna D, Maestas J, McGuire PG, Das A. Suppression of retinal neovascularization with an antagonist to vascular endothelial cadherin. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 2008; 126(8):1082–8. doi: 10.1001/archophth.126.8.1082.
130. Nishijima K, Ng YS, Zhong L, Bradley J, Schubert W, Jo N, Akita J, Samuelsson SJ, Robinson GS, Adamis AP, Shima DT. Vascular endothelial growth factor-A is a survival

- factor for retinal neurons and a critical neuroprotectant during the adaptive response to ischemic injury. *The American journal of pathology* 2007; 171(1):53–67. doi: 10.2353/ajpath.2007.061237.
131. Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *The Journal Of Cell Biology* 2003; 161(3):653–60. doi: 10.1083/jcb.200302070.
132. Nussenblatt RB, Kaufman SC, Palestine AG, Davis MD, Ferris FL. Macular Thickening and Visual Acuity. *Ophthalmology* 1987; 94(9):1134–9. doi: 10.1016/S0161-6420(87)33314-7.
133. Orlova VV, Economopoulou M, Lupu F, Santoso S, Chavakis T. Junctional adhesion molecule-C regulates vascular endothelial permeability by modulating VE-cadherin-mediated cell-cell contacts. *The Journal of experimental medicine* 2006; 203(12):2703–14. doi: 10.1084/jem.20051730.
134. Pardridge WM, Metus LI. Regional blood-brain barrier transport of the steroid hormones. *Journal of Neurochemistry* 1979; 33(2):579–81. Verfügbar unter: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-4159.1979.tb05192.x/full>.
135. Parish CR. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunology and cell biology* 1999; 77(6):499–508. doi: 10.1046/j.1440-1711.1999.00877.x.
136. Pe'er J, Folberg R, Itin A, Gnessin H, Hemo I, Keshet E. Upregulated expression of vascular endothelial growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *The British Journal of Ophthalmology* 1996; 80(3):241–5.
137. Peng S, Adelman RA, Rizzolo LJ. Minimal effects of VEGF and anti-VEGF drugs on the permeability or selectivity of RPE tight junctions. *Investigative ophthalmology & visual science* 2010; 51(6):3216–25. doi: 10.1167/iovs.09-4162.
138. Pérez-Álvarez MJ, Isiegas C, Santano C, Salazar JJ, Ramírez AI, Triviño A, Ramírez JM, Albar JP, La Rosa Ed, Prada C. Vimentin isoform expression in the human retina characterized with the monoclonal antibody 3CB2. *Journal of Neuroscience Research* 2008; 86(8):1871–83. doi: 10.1002/jnr.21623.
139. Perryn ED, Czirók A, Little CD. Vascular sprout formation entails tissue deformations and VE-cadherin dependent cell-autonomous motility. *Developmental biology* 2008; 313(2):545–55. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.10.036.

140. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J. The Effect of Spironolactone on Morbidity and Mortality in Patients with Severe Heart Failure. *New England Journal of Medicine* 1999; 341(10):709–17. doi: 10.1056/NEJM199909023411001.
141. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 2011; 146(6):873–87. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.039.
142. Rahimy E, Pitcher JD, Hsu J, Adam MK, Shahlaee A, Samara WA, Vander JF, Kaiser RS, Chiang A, Spirn MJ, Fineman MS. A RANDOMIZED DOUBLE-BLIND PLACEBO-CONTROL PILOT STUDY OF EPLERENONE FOR THE TREATMENT OF CENTRAL SEROUS CHORIORETINOPATHY (ECSELSIOR). *Retina (Philadelphia, Pa.)* 2018; 38(5):962–9. doi: 10.1097/IAE.0000000000001649.
143. Rakic JM, Lambert V, Devy L, Lutun A, Carmeliet P, Claes C, Nguyen L, Foidart JM, Noel A, Munaut C. Placental growth factor, a member of the VEGF family, contributes to the development of choroidal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science* 2003; 44(7):3186–93.
144. Rakoczy E MJT, Nusinowitz S, Chang B, Heckenlively JR. Mouse models of age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research* 2006; 82(5):741–52. doi: 10.1016/j.exer.2005.10.012.
145. Ratajczak MZ, Ratajczak J, Machalinski B, Majka M, Marlicz W, Carter A, Pietrzowski Z, Gswirtz AM. Role of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta-derived growth factor (PIGF) in regulating human haemopoietic cell growth. *British Journal of Haematology* 1998; 103(4):969–79. Verfügbar unter: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2141.1998.01076.x/full>.
146. Reichenbach A, Bringmann A. Müller cells in the healthy and diseased retina. New York, NY: Springer; 2010.
147. Reichhart N, Haase N, Crespo-Garcia S, Skosyrski S, Herrspiegel C, Kociok N, Fuchshofer R, Dillinger A, Poglitsch M, Muller DN, Jousen AM, Luft FC, Dechend R, Strauss O. Hypertensive retinopathy in a transgenic angiotensin-based model. *Clinical science (London, England : 1979)* 2016; 130(13):1075–88. doi: 10.1042/CS20160092.
148. Rescigno M, Rotta G, Valzasina B, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. *Immunobiology* 2001; 204(5):572–81. doi: 10.1078/0171-2985-00094.

149. Rudini N, Felici A, Giampietro C, Lampugnani M, Corada M, Swirsding K, Garrè M, Liebner S, Letarte M, Dijke P ten, Dejana E. VE-cadherin is a critical endothelial regulator of TGF- β signalling. *The EMBO Journal* 2008; 27(7):993–1004. doi: 10.1038/emboj.2008.46.
150. Sack U, Tárnok A, Rothe G, Hrsg. *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Basel: Karger; 2007.
151. Sander B, Larsen M, Moldow B, Lund-Andersen H. Diabetic macular edema: passive and active transport of fluorescein through the blood-retina barrier. *Investigative ophthalmology & visual science* 2001; 42(2):433–8.
152. Satofuka S, Ichihara A, Nagai N, Noda K, Ozawa Y, Fukamizu A, Tsubota K, Itoh H, Oike Y, Ishida S. (Pro)renin Receptor Promotes Choroidal Neovascularization by Activating Its Signal Transduction and Tissue Renin-Angiotensin System. *The American journal of pathology* 2008; 173(6):1911–8. doi: 10.2353/ajpath.2008.080457.
153. Scartozzi M, Vincent L, Chiron M, Cascinu S. Aflibercept, a New Way to Target Angiogenesis in the Second Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer (mCRC). *Targeted Oncology* 2016; 11(4):489–500. doi: 10.1007/s11523-016-0447-4.
154. Schultz SG. Electrical potential differences and electromotive forces in epithelial tissues. *The Journal of general physiology* 1972; 59(6):794–8.
155. Shin JY, Sohn J, Park KH. Chlorogenic Acid Decreases Retinal Vascular Hyperpermeability in Diabetic Rat Model. *Journal of Korean Medical Science* 2013; 28(4):608–13. doi: 10.3346/jkms.2013.28.4.608.
156. Shiose Y, Oguri M. Electron microscopic studies on the blood-retinal barrier and the blood-aqueous barrier. *Nippon Ganka Gakkai zasshi* 1969; 73(9):1606–22.
157. Siegenthaler W, Amann-Vesti BR. *Klinische Pathophysiologie*. Berlin: Thieme; 2006.
158. Song J, Kang SM, Lee WT, Park KA, Lee KM, Lee JE. Glutathione protects brain endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress by increasing nrf2 expression. *Experimental neurobiology* 2014; 23(1):93–103. doi: 10.5607/en.2014.23.1.93.
159. Soubrier F, Wei L, Hubert C, Clauser E, Alhenc-Gelas F, Corvol P. Molecular biology of the angiotensin I converting enzyme: II. Structure-function. Gene polymorphism and clinical implications. *Journal of hypertension* 1993; 11(6):599–604.
160. Spaide RF. Rationale for Combination Therapies for Choroidal Neovascularization. *American Journal of Ophthalmology* 2006; 141(1):149–56. doi: 10.1016/j.ajo.2005.07.025.

161. Steen B, Sejersen S, Berglin L, Seregard S, Kvanta A. Matrix metalloproteinases and metalloproteinase inhibitors in choroidal neovascular membranes. *Investigative ophthalmology & visual science* 1998; 39(11):2194–200.
162. Stockand JD, Meszaros JG. Aldosterone stimulates proliferation of cardiac fibroblasts by activating Ki-RasA and MAPK1/2 signaling. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2003; 284(1):H176-H184. doi: 10.1152/ajpheart.00421.2002.
163. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological reviews* 2005; 85(3):845–81. doi: 10.1152/physrev.00021.2004.
164. Sun Y, Zhang J, Lu L, Chen SS, Quinn MT, Weber KT. Aldosterone-induced inflammation in the rat heart: Role of oxidative stress. *The American journal of pathology* 2002; 161(5):1773–81. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64454-9.
165. Taddei A, Giampietro C, Conti A, Orsenigo F, Breviario F, Pirazzoli V, Potente M, Daly C, Dimmeler S, Dejana E. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nature Cell Biology* 2008; 10(8):923–34. doi: 10.1038/ncb1752.
166. Tian R, Luo Y, Liu Q, Cai M, Li J, Sun W, Wang J, He C, Liu Y, Liu X. The effect of claudin-5 overexpression on the interactions of claudin-1 and -2 and barrier function in retinal cells. *Current molecular medicine* 2014; 14(9):1226–37.
167. Tombran-Tink J, Barnstable CJ. *Ocular Transporters in Ophthalmic Diseases and Drug Delivery*. 1. Auflage. Totowa: Humana Press; 2008.
168. Tong JP, Chan WM, Liu DT, Lai TY, Choy KW, Pang CP, Lam DS. Aqueous humor levels of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor in polypoidal choroidal vasculopathy and choroidal neovascularization. *American Journal of Ophthalmology* 2006; 141(3):456–62. doi: 10.1016/j.ajo.2005.10.012.
169. Tout S, Chan-Ling T, Holländer H, Stone J. The role of müller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience* 1993; 55(1):291–301. doi: 10.1016/0306-4522(93)90473-S.
170. van Kooij B, Fijnheer R, Boer J de, Dam-van LN ten, Bartelink I, Roest M, Rothova A. A randomized, masked, cross-over trial of lisinopril for inflammatory macular edema. *American Journal of Ophthalmology* 2006; 141(4):646–51. doi: 10.1016/j.ajo.2005.11.056.
171. vector laboratories. vector laboratories [Stand: 22.08.2016]. Verfügbar unter: <https://vectorlabs.com/biotinylated-gsl-i-isolectin-b4.html>.

172. Verkman AS, Mitra AK. Structure and function of aquaporin water channels. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 2000; 278(1):F13-F28.
173. Watanabe A, Arimoto S, Nishi O. Correlation between metamorphopsia and epiretinal membrane optical coherence tomography findings. *Ophthalmology* 2009; 116(9):1788–93. doi: 10.1016/j.ophtha.2009.04.046.
174. Weston SA, Parish CR. New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *Journal of immunological methods* 1990; 133(1):87–97.
175. White A, JR, Cheruvu SC, Sarris M, Liyanage SS, Lumbers E, Chui J, Wakefield D, McCluskey PJ. Expression of classical components of the renin-angiotensin system in the human eye. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 2014; (1):59–66. doi: 10.1177/1470320314549791.
176. Wilkinson-Berka JL, Rana I, Armani R, Agrotis A. Reactive oxygen species, Nox and angiotensin II in angiogenesis: implications for retinopathy. *Clinical science (London, England : 1979)* 2013; 124(10):597–615. doi: 10.1042/CS20120212.
177. Wilkinson-Berka JL, Tan G, Jaworski K, Miller AG. Identification of a Retinal Aldosterone System and the Protective Effects of Mineralocorticoid Receptor Antagonism on Retinal Vascular Pathology. *Circulation Research* 2009; 104(1):124–33. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.176008.
178. Wojewodzka-Zelezniakowicz M, Gromotowicz-Poplawska A, Kisiel W, Konarzewska E, Szemraj J, Ladny JR, Chabielska E. Angiotensin-converting enzyme inhibitors attenuate propofol-induced pro-oxidative and antifibrinolytic effect in human endothelial cells. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 2017; 2017(18). doi: 10.1177/1470320316687197.
179. Wong TY, Klein R, Sun C, Mitchell P, Couper DJ, Lai H, Hubbard LD, Sharrett AR. Age-related macular degeneration and risk for stroke. *Annals of internal medicine* 2006; 145(2):98–106.
180. Xia C, Lu E, Zeng J, Gong X. Deletion of LRP5 in VLDLR Knockout Mice Inhibits Retinal Neovascularization. *PloS one* 2013; 8(9). doi: 10.1371/journal.pone.0075186.
181. Yang S, Zhao J, Sun X. Resistance to anti-VEGF therapy in neovascular age-related macular degeneration: a comprehensive review. *Drug design, development and therapy* 2016; 10:1857–67. doi: 10.2147/DDDT.S97653.

182. Yannuzzi LA, Sorenson J, Spaide RF, Lipson B. Idiopathic polypoidal choroidal vasculopathy (IPCV). 1990. *Retina* (Philadelphia, Pa.) 2012; 32 Suppl 1:1–8.
183. Yi X, Ogata N, Komada M, Yamamoto C, Takahashi K, Omori K, Uyama M. Vascular endothelial growth factor expression in choroidal neovascularization in rats. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 1997; 235(5):313–9. doi: 10.1007/BF01739641.
184. Young RW. Pathophysiology of age-related macular degeneration. *Survey of Ophthalmology* 1987; 31(5):291–306. doi: 10.1016/0039-6257(87)90115-9.
185. Yuzawa M, Fujita K, Tanaka E, Wang ECY. Assessing quality of life in the treatment of patients with age-related macular degeneration: clinical research findings and recommendations for clinical practice. *Clinical Ophthalmology* 2013; Volume 7:1325–32. doi: 10.2147/OPHTH.S45248.
186. Zhang JZ, Gao L, Widness M, Xi X, Kern TS. Captopril inhibits glucose accumulation in retinal cells in diabetes. *Investigative ophthalmology & visual science* 2003; 44(9):4001–5.
187. Zhao M, Valamanesh F, Celerier I, Savoldelli M, Jonet L, Jeanny J-C, Jaisser F, Farman N, Behar-Cohen F. The neuroretina is a novel mineralocorticoid target: aldosterone up-regulates ion and water channels in Müller glial cells. *The FASEB Journal* 2010; 24(9):3405–15. doi: 10.1096/fj.09-154344.
188. Zola M, Daruich A, Matet A, Mantel I, Behar-Cohen F. Two-year follow-up of mineralocorticoid receptor antagonists for chronic central serous chorioretinopathy. *The British Journal of Ophthalmology* 2018. doi: 10.1136/bjophthalmol-2018-312892.

10 Anhang

10.1 Tabellen zu Material und Methoden

Geräte/Software	Firma/Herkunft
Laser 75 µm	Heidelberg Engineering
Iris Medical	Heidelberg Engineering
HAAG Streit Bern	Heidelberg Engineering
OcuLight GL	Heidelberg Engineering
Iridex	Heidelberg Engineering
Smart Flow Belüftungsanlage	Tecniplast
Plastikmäusekäfige	Tecniplast
Heidelberg Spectralis HRA +OCT	Heidelberg Engineering
Heidelberg Eye Explorer (Version 1.7.1.0)	Heidelberg Engineering
Photoshop Version 2015 CC	Adobe
Additional add on lense (+25 spherical diopters)	
Scales	
Schutzbrille Lumenis L99-Argon-IU	Lumenis
Kirschkernkissen	
100µl Glas Syringe	HAMILTON COMPANY Harvard No. 409474

Tabelle 18 Geräte und Zubehör für das Mausmodell der laserinduzierten CNV und in Vivo Imaging

Lösung/Reagenz	Firma/Herkunft
Spirolactone S3378-1G C ₂₄ H ₃₂ O ₄ S	Sigma-Aldrich PCode: 1001165569 CAS 52-01-7
Dimethyl sulfoxide D8418-100ML	SIGMA Life science
Olive Oil O1514-100ML	SIGMA Life science
Phenylephrine hydrochloride (Neosynephrin 5%)	Ursapharm Arzneimittel GmbH Saarbrücken, Germany)
Cyclopentolate hydrochloride (Zyklolat EDO)	Dr. Mann Pharma und Bausch & Lomb GmbH, Berlin, Germany)
Proparakain-POS 0,5% Augentropfen	URSAPHARM
NaCL 0,9%	Braun
Ketamine 10% 10ml+ Xylazin 1ml	WDT Garbsen
B506 Forene 100% (V/V) Isofluran	Abbott
Methocel 2% Sterile	OmniVision CE 0344
Aqua ad iniectabilia Braun	Braun
Fluorescein ACLON 10% Injektionslösung Verwendet in Verdünnung 1:10	H12588-0113
Viscotears Augen Gel	Novartis
Bepanthen Augensalbe	Bepanthen

Tabelle 19 Lösungen, Reagenzien und Therapeutika

Artikel	Firma/Herkunft
Handschuhe	BRAUN
Kosmetiktücher	
Injekt-F Sterile 0,01ml-1ml + 25G (0,5mmx16mm) Nadel Tuberkulin	Braun BRAUN REF 9166033V
Eppendorfgefäße	Eppendorf

Tabelle 20 Verbrauchsartikel Mausmodell und In Vivo Imaging

Versuch	Tiere	Tiere/ Gruppe	Tiere In Vivo Imaging	LH FAG (je Gruppe)	LH OCT (je Gruppe)	Herkunft
Versuch 1 14 dpl	6	2	3	36 (A14/K13/S 9)	-	ZTE
Versuch 2 3 dpl	12	4	6	48 (A16/K16/S16)	43 (A14/K14/S15)	ZTE
Versuch 3 14 dpl	12	4	6	44 (A16/K16/S12)	35 (A11/K12/S12)	ZTE
Versuch 4 3 dpl	12	4	6	47 (A16/K15/S16)	35 (A12/K11/S12)	Charles River
Versuch 5 14 dpl	12	4	6	48 (A16/K16/S16)	40 (A13/K12/S15)	ZTE
Gesamt	54		27	223	153	
3dpl	24		12	95 (A32/K31/S32)	78 (A26/K25/S27)	
14 dpl	30		15	128 (A46/K45/S37)	75 (A24/K24/S27)	

Tabelle 21 Versuchsaufbau der Mausversuche

Material	Firma/Herkunft
Ethanol 70% (denaturiert)	AppliChem
Ethanol 100% vergällt	Berkel AHK
Xylol (Isomere) C ₈ H ₁₀ >98% rein, für die Histologie	ROTH Art.-Nr. 9713.3
Paraffin	
Formaldehyd-Lösung 37%	Roth
Albumin from bovine serum (BSA) >98% (agarose gel electrophoresis) lyophilized powder	SIGMA Life Science PCode 1001512037
Citratpuffer	
Power Block™ Universal Blocking Reagent (10x) Buffered casein solution with preservative	BioGenex REF:HK085-5KE
Aqua Dest	
Immu-Mount	Thermo Scientific
Citratpuffer	
Dako Pen	Dako Denmark
Färbekasten nach Schiefferdecker Glas mit Deckel, spülmaschinenfest	Diagonal Artikelnummer 632499890001
Färbeeinsatz aus Glas mit Drahtbügel	Diagonal Artikelnummer 4200005
Färbekasten nach Hellendahl	Diagonal Artikelnummer 474400

Objektträgerkasten	Heathrow Scientific
Objektträger 76x26 mm geputzt/gebrauchsfertig	STAR FROST
Deckgläser 24x50mm	
Eindeckkassetten	
Pinzette	
Präparierschere	
Lichtundurchlässige Feuchtkammer	

Tabelle 22 Materialien Immunhistochemische Methoden

Gewicht (g)	Ketamine/Xylazine (μ l)
4	5
6	7
8	10
10	13
12	15
14	18
16	21
18	23
20	26
22	30
24	32
26	35
28	39
30	42
32	45

Tabelle 23 Gewichtsadaptiertes Injektionsvolumen bei intraperitonealer Ketaminarkose

1. Antikörper	Herkunft	Konzentration	Verdünnung	Firma
Anti-Vimentin	Chicken	0,3 mg/ml	1:50	Abcam
Anti-VE-Cadherin	Goat			R&D Systems
Anti-Claudin-5	Rabbit	0,25 mg/ml	1:100	Zymed Laboratories (Thermo Scientific)
Isolektin B4 (Bindet an Endothelzellen (171) und Mikroglia)	Markierung: Biotin		1:25	Biozol Diagnostica Vector Laboratories
Anti-AQP 4	Rabbit	1 mg/ml	1:200	Merck
Anti-GLUT-1	Rabbit	1mg/ml	1:100	Millipore
Anti-VEGF	Chicken	1mg/ml	1:50	Abcam
Anti-ZO-1	Rabbit	0,25 mg/ml	1:100	Invitrogen (Thermo Scientific)
2. Antikörper (Labor-Nr.)	Spezifität/ Herkunft	Fluoreszenz	Konzentration/ Verdünnung	Firma
2-02	Anti-Rabbit/ Donkey	Alexa Fluor 488	2mg/ml 1:200	life technologies (Thermo Scientific)

2-04	Anti Goat/ Donkey	Alexa Fluor 488	2mg/ml 1:200	life technologies (Thermo Scientific)
2-05	Anti-Goat/ Donkey	Texas Red AF594	2mg/ml 1:200	life technologies (Thermo Scientific)
2-08	Anti- Chicken/ Goat	Texas Red AF594	2mg/ml 1:200	life technologies (Thermo Scientific)
2-09	Anti-Rabbit/ Goat	Cy 3	2mg/ml 1:200	life technologies (Thermo Scientific)
Streptavidin CAS- Nr. 366796-16-9	Anti - Isolektin	Alexa Fluor 488	2 mg/ml 1:100	Life technologies (Thermo Scientific)
Streptavidin	Anti - Isolektin	Alexa Fluor 647	2 mg/ml 1:100	Invitrogen (Thermo Scientific)
DAPI				

Tabelle 24 Antikörper

Geräte	Firma/Herkunft
Wärmeschrank	Memmert
Feinwage ACS 1204	KERN ACJ/ACS
Sterilbank mit Abzug	Waldner
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Microm Section Transfer System	Thermo Scientific
Mikrom HM 355s Mikrotom	Thermo Scientific
Microm EC 350-2 Kühlplatte	Thermo Scientific
EVOS Core XL Lichtmikroskop	Advanced Microscopy Group
EVOS fl Fluoreszenzmikroskop Digital inverted Microscop	Advanced Microscopy Group (AMG)
Photoshop	Version 2015 CC
HIR 3 Wasserbad	Kunz instruments
HP 3 Heizplatte für Objektträger	Kunz instruments
Eindeckautomat	
Tribute Collection Dampfgarer FS 3000	Braun
Sky Line SHAKER DRS-12	ELMI North America
Rotator 2-1175 mit fixer Drehzahl	neoLab Heidelberg
Chirurgische Pinzette	Martin Germany CE 12-301-18
Anatomische Pinzette	Hermle

	CE 701
Präparierschere	Hermle CE 562

Tabelle 25 Geräte Immunhistochemie

Ethanol Konzentration	Dauer
Ethanol 70 %	30 min
Ethanol 80 %	3 x 30 min
Ethanol 90 %	2 x 30 min
Ethanol 96 %	2 x 30 min
Ethanol absolut	2 x 30 min, über Nacht

Tabelle 26 Alkoholreihe Paraffineinbettung

Reagenz	Dauer
Xylol I	5 min
Xylol II	5 min
Ethanol 100% I	5 min
Ethanol 100% II	5 min
Ethanol 96%	5 min
Ethanol 90%	5 min
Ethanol 80% Ethanol 70%	5 min
Fließendes Leitungswasser	5 min
Aqua dest	5 min

Tabelle 27 Entparaffinierung

Produkt	Firma/Herkunft
Human retinal endothelial cells Primärzelllinie	Science Cell
Vascu Life Basal Medium	Life Line Cell Technology
Vascu Life EnGS – Life Factors EnGS 0.2% Rh EGF 5 ng/ml Ascorbic Acid 50 µg/ml L-Glutamine 10 mM Hydrocortisone Hemisuccinate 1.0 µg/ml Heparin Sulfate 0.75 U/ml FBS 2 %	Life Line Cell Technology

Tabelle 28 Zelllinie, Zellkulturmedium und Zusätze

Lösung/Reagenz	Firma/Herkunft
Aldosterone A9477 <i>Ansatz:</i> <i>5 mg Aldosteron auf 13,87 ml DMSO = 1mM</i> CAS-Nr. 52-39-1	Sigma Aldrich
Attachement Factor Solution	Cell Applications Inc.
CaliBRITE™ APC Batch No. 18850	BD Biosciences
InvitrogenCell-Trace CFSE-cell proliferation kit for flow cytometry	Thermo Fisher Scientific
Dimethyl Sulfoxide CAS: 67-68-5	Sigma Aldrich
Ethanol 70 %, vergällt	Hausapotheke WWU Münster
Dulbeccos PBS (1x)	PAA-Laboratories
NaNO ₃ – Natriumazid	
FCS	
Hydrogen Peroxide 30 % in water CAS: 7722-84-1,7732-18-5	Fisher Scientific
Hoechst 33258 bisBenzimide	Sigma Aldrich
Spironolactone 53378-1G <i>Ansatz:</i> <i>42 mg auf 1 ml DMSO = 10 mM</i> CAS: 52017	Sigma Aldrich
Invitrogen - TrpE™-Express 12604	Thermo Fisher Scientific
Invitrogen VEGF recombinant Human protein	Thermo Fisher Scientific
FACS – Puffer <i>500µl NaNO₃</i> <i>+ 500µl steril filtriertes FCS (0,22 µm Poren)</i> <i>in jeweils 500ml PBS</i>	Eigene Rezeptur

= 0,1% Natriumazid und 0,1% FCS	
---------------------------------	--

Tabelle 29 Lösung und Reagenzien für zellbiologische Methoden

Gerät/Software	Firma/Herkunft
Centrifuge 5810R	Eppendorf
FACSCanto II	BD-Scientific
FACS-DIVA-Software	BD Scientific
MCO-20AIC-Co ₂ Inkubator	SANYO
Kryotank- Locator 6 plus cryo biological system	Thermolyne
GraphPadPrism 6/7	GraphPad Software
SPSS Statistics 24	IBM
Microsoft Office Excel	Microsoft
Sterilbank	Heraeus
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss
Vakuumpumpe SUE 300 Q	Heto Master
Autoclave Systec VX-75	Systec GmbH
Universal Wärmeschrank UFP	Memmert GmbH
Heißluftsterilisator ST 6120	Heraeus
Pipetten Eppendorf Research Plus	Eppendorf
Pipettus accu-jet pro	BRAND
Stepper	Nicht bekannt
Neubauer Zählkammer <i>0,1mm Tiefe</i> <i>0,0025 mm²</i>	Assistant Germany
Vortex Genie 2	Scientific industries
Wasserbad	GFL

Tabelle 30 Geräte und Software für zellbiologische Methoden

Artikel	Firma/Herkunft
Einmalhandschuhe	BRAUN
Eppendorf Safe Lock Gefäße 1,5 ml 0,5 ml	Eppendorf
Falcons 50 ml 15ml	BD Biosciences
Cellstar Tubes	
Glaspipetten Costar Stripette 10ml 5ml	Corning Incorporated
Pasteur Pipetten	Hausapotheke WWU Münster
Pipettenspitzen 100 – 1000 µl 10 – 100 µl 1 – 10 µl 0,5 – 2,5 µl	BD Biosciences
BD Tips sterile 5ml	BD Biosciences
Zellkulturflaschn 75 cm ²	TPP, Biochrom AG
Zellkultur Testplatten 24 Well	TPP, Biochrom AG

Tabelle 31 Verbrauchsartikel für molekularbiologische Methoden

Parameter	Wert
FSC	60
SSC	210
CFSE	260
APC	500
Pacific blue	450

Tabelle 32 Parametereinstellung FACS-Gerät

10.2 Zusammenfassung der In Vivo Ergebnisse

		OCT			FAG				
		Zentrale Retinadicke	LH - Durchmesser	CNV	LH-Fläche	Leckage		Leckage * LH Größe	
						Früh	Spät		
3 dpl	Aldosteron	218	1861,25	-	24595,50	37,37	85,60	1109879,10	2060857,04
	Kontrolle	205	2015,50	-	28372,50	35,07	67,11	1080231,94	2380145,26
	Spironolacton	205	1775,00	-	26177,88	30,70	65,81	982488,64	1826630,28
Ergebnisse		Grafik: Aldo>Kontr/Spiro; ZRD Aldosteron ist signifikant höher als ZRD Kontrolle MWU p=0,0016	Keine signifikanten Ergebnisse KWT= 0,552	-	Keine signifikanten Ergebnisse KWT: p=0,455	Frühphase Tendenz Aldo> Kontr > Spiro Keine Signifikanzen KWT: Früh p=0,468 KWT: Spät p=0,113	Keine signifikanten Ergebnisse KWT: Früh p=0,987 KWT: Spät p=316		
14 dpl	Aldosteron	242,5	2346,50	0,180	22231,88	41,17	73,18	905891,28	1553150,72
	Kontrolle	255	2367,50	0,158	19884,50	43,80	68,08	944547,20	1550170,80
	Spironolacton	210	2108,00	0,115	19653,50	40,79	66,57	755005,75	1598829,06

Ergebnisse		Grafik: Aldo/Kontr > Spiro; ZRD Spironolacton signifikant geringer als ZRD Kontrolle und ZRD Aldosteron	Grafik: Leichte Tendenz Aldo/Kontr >Spiro Nicht signifikant KWT p=0,408	Grafik: Aldo > Kontr >Spiro Signifikant: Aldo > Spiro	Keine signifikanten Ergebnisse KWT: p =0,209	Früh- und Spätphase Tendenz Aldo>Kontr>Spiro Keine Signifikanzen KWT:Früh p=0,685 KWT: Spät p=0,685	Keine signifikanten Ergebnisse KWT: Früh p=0,254 KWT: Spät p=0,624
		OCT: Dynamik - Laserherddurchmesser			FAG: Dynamik - Laserherdfläche		
3- 14 dpl	Aldosteron	218 → 242,5	= 24,5	24595,5 → 22231,88	= - 2363,62		
	Kontrolle	205 → 255	= 50	28372,5 → 19884,5	= - 8488		
	Spironolacton	205 → 210	= 5	26177,88 → 19653,5	= - 6524,38		
Ergebnisse		Jeweils Größenzunahme, am geringsten bei Spironolacton Kontrolle > Aldosteron > Spironolacton Aldosteron – LH-Durchmesser signifikant erhöht nach 14 dpl			Jeweils Flächeabnahme, am geringsten bei Aldosteron Aldosteron < Spironolacton < Kontrolle Spironolactongruppe und Kontrolle – LH – Fläche signifikant kleiner		

10.3 Tierversuchsgenehmigung

Landesamt für Natur,
Umwelt und Verbraucherschutz
Nordrhein-Westfalen



LANUV NRW, Postfach 10 10 52, 45610 Recklinghausen

Herrn
Dr. Peter Heiduschka
Klinik für Augenheilkunde
Universitätsklinikum Münster
Domagkstr. 15
48149 Münster

Auskunft erteilt:
Frau Wegener
Direktwahl 02361-305-3212
Fax 02361/305-3062
fachbereich84@lanuv.nrw.de

Aktenzeichen
84-02.04.2016.A395
bei Antwort bitte angeben
Ihre Nachricht vom:
Ihr Aktenzeichen:

Datum: 24.03.2017

Tierschutz
Genehmigung von Versuchen an Wirbeltieren gemäß § 8 Abs. 1
TierSchG i.V.m. § 33 TierSchVersV
Ihr Antrag vom 21.07.2016, eingegangen am 02.09.2016
Ihr Schreiben vom 13.02.2017, eingegangen am 20.02.2017

Hauptsitz:
Leibnizstraße 10
45659 Recklinghausen
Telefon 02361 305-0
Fax 02361 305-3215
poststelle@lanuv.nrw.de
www.lanuv.nrw.de

Sehr geehrter Herr Dr. Heiduschka,

I. Gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) in der derzeit gültigen Fassung i. V. m. § 33 der Verordnung zum Schutz von zu Versuchszwecken oder zu anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tieren (Tierschutz-Versuchstierverordnung - TierSchVersV) vom 01. August 2013 (BGBl I, S.3125) erteile ich Ihnen unter dem Vorbehalt des jederzeitigen Widerrufs die Genehmigung zur Durchführung des nachstehenden Tierversuches:

„Inhibition der choroidalen Neovaskularisation“.

II. Die Verantwortung für die Durchführung des Tierversuchsvorhabens obliegt folgenden Personen:

Verantwortlicher Leiter: Dr. Peter Heiduschka
Stellvertretender Leiter: Dr. Nicole Eter

III. An der Durchführung des Tierversuchsvorhabens dürfen neben dem Leiter und dem Stellvertreter des Versuchsvorhabens keine weiteren Personen beteiligt werden.

Dienstgebäude:
Hauptsitz Recklinghausen

Öffentliche Verkehrsmittel:
Ab Recklinghausen Hbf mit
Buslinie 236 bis Haltestelle
"Siemensstraße" und 5 Min.
Fußweg oder mit Buslinie SB 20
bis Haltestelle "Hohenhorster
Weg" und 15 Min. Fußweg in
Richtung Trabrennbahn bis
Leibnizstraße

Bankverbindung:
Landeskasse Düsseldorf
Konto-Nr.: 41 000 12
West LB AG
(BLZ 300 500 00)
BIC-Code: WELADED3
IBAN-Code: DE 41 3005
0000 0004 1000 12

IV. Die Versuche dürfen nur im Forschungslabor der Augenklinik, Domagkstr. 19, Raum 100.016 und 100.017, 48149 Münster durchgeführt werden. Seite 2 /

V. Eine rückblickende Bewertung nach § 35 TierSchVersV ist nicht vorzunehmen.

VI. Die Genehmigung erstreckt sich auf Versuche mit :

Maus : 1020

VII. Sie haben folgende Auflagen zu beachten:

1. Ist ein Transport der Versuchstiere zwischen Operations- und Tierhaltungsraum unvermeidbar, so ist dafür Sorge zu tragen, dass mit Hilfe geeigneter Behältnisse dieser Transport so durchgeführt wird, dass negative Beeinflussungen durch äußere Einflüsse (z. B. Witterung, Lärm etc.) ausgeschlossen sind. Es ist insbesondere darauf zu achten, dass die Tiere keinen Temperaturschwankungen ausgesetzt sind.
2. Unabhängig von den im Antrag angeführten Abbruchkriterien ist der Versuch abubrechen und das betroffene Tier tierschutzgerecht zu töten, wenn dies aufgrund des Zustandes des Tieres nach der Einschätzung des Tierschutzbeauftragten aus Tierschutzgründen unerlässlich ist.
3. Sie werden gebeten, nach Erhalt der Genehmigung eine aktualisierte Zusammenfassung elektronisch zu übersenden, die den Inhalt der Genehmigung vollständig und richtig darstellt.

VIII. Diese Genehmigung ist bis zum **31.03.2022** befristet.

IX. Für diesen Bescheid wird eine Gebühr erhoben. Hierzu ergeht ein gesonderter Gebührenbescheid.

Erläuterungen und Begründung:

zu I.:

Der Inhalt Ihrer Antragsunterlagen ist Gegenstand dieser Genehmigung. Änderungen sind dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW unverzüglich - unter Angabe des Aktenzeichens - anzuzeigen (§ 34

Abs. 1 Nr. 4 TierSchVersV). Es wird empfohlen, allen an der Tierversuchsdurchführung beteiligten Personen diese Genehmigung zur Kenntnis zu geben. Der Tierschutzbeauftragte Dr. Martin Lücke und das zuständige Veterinäramt der Stadt Münster erhalten eine Durchschrift dieser Genehmigung.

Seite 3 /

Der Widerruf dieser Genehmigung kann erfolgen, wenn gegen diese Genehmigung verstoßen wird.

Außerdem kann die Einstellung des Tierversuchs gemäß § 16 a TierSchG angeordnet werden, wenn Tierversuche ohne die erforderliche Genehmigung oder entgegen tierschutzrechtlicher Bestimmungen durchgeführt werden.

Eventuell erforderliche Ausnahmegenehmigungen nach dem Tierschutzgesetz oder anderen gesetzlichen Bestimmungen bleiben von dieser Genehmigung unberührt.

zu II.:

Für die Einhaltung der Vorschriften des Tierschutzgesetzes sowie der in dieser Genehmigung angeführten Voraussetzungen ist der bzw. die oben bezeichnete Leiter/in des Tierversuchsvorhabens oder im Falle dessen/deren Verhinderung sein/ihr in dieser Genehmigung bezeichnete/r Vertreter/in verantwortlich (§ 30 TierSchVersV). Dabei ist jeder beabsichtigte Wechsel der Versuchsleiter- oder Stellvertreterposition dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW unverzüglich anzuzeigen (§ 34 Abs. 2 TierSchVersV).

zu III.:

Die bezeichneten Personen dürfen ausschließlich die im Genehmigungsantrag aufgeführten Eingriffe oder Behandlungen im Rahmen der zulässigen Verantwortlichkeitsstufe durchführen. Zu beachten ist, dass Personen, die Eingriffe und Behandlungen innerhalb des Versuchsvorhabens durchführen sollen und die Voraussetzungen nach § 16 Abs. 1 Sätze 2 und 3 der TierSchVersV nicht erfüllen, erst nach Erteilung einer Ausnahmegenehmigung gem. § 16 Abs. 1 Satz 5 TierSchVersV durch die zuständige Kreisordnungsbehörde eingesetzt werden dürfen.

zu VIII.:

Diese Genehmigung ist zeitlich bis zum o. g. Termin befristet, so dass mir vor Ablauf der Genehmigungsfrist ggf. der Abschluss des Tierversuchsvorhabens mitzuteilen ist. Sollte das Tierversuchsvorhaben innerhalb des zeitlichen Genehmigungsrahmens noch nicht abgeschlossen sein, ist rechtzeitig vor

Ablauf der Genehmigungsfrist - über den zuständigen Tierschutzbeauftragten Seite 4 /
- ein Antrag auf Verlängerung des Tierversuchsvorhabens zu stellen.

Rechtsbehelfsbelehrung:

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch bei dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW, Leibnizstr. 10, 45659 Recklinghausen erhoben werden.

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag



(Dr. Sommerfeld)

DER
OBERBÜRGERMEISTERSTADT  MÜNSTER

Postanschrift: Stadt Münster • 48127 Münster

Universitätsklinikum Münster
Klinik für Augenheilkunde
PD Dr. rer. nat. Peter Heiduschka
Albert-Schweitzer-Campus 1, D15

48149 Münster

Amt für Gesundheit,
Veterinär- und
LebensmittelanliegenheitenNiederdingstraße 30 a
48155 MünsterAuskunft erteilt:
Frau Boenigk
Zimmer: 12
Telefon: 0251/384833 - 14
Telefax: 0251/384833 - 49
E-Mail:
BoenigkR@stadt-muenster.de
Sprechzeiten:
nach Vereinbarung

Münster, 31.01.2013

Datum und Zeichen Ihres Schreibens:
12.12.2012Mein Zeichen (Bitte angeben):
39.32.6.1.3**Tierschutz****Antrag auf Ausnahmegenehmigung nach § 9 Abs.1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) für nicht operative Eingriffe an Wirbeltieren für Frau cand. med. Nadine ROHLOFF, geb. am 17.08.1992**

Sehr geehrter Herr Dr. Heiduschka,

aufgrund der vorliegenden Bescheinigung über einen erfolgreich abgeschlossenen Kursus für Versuchstierkunde erteile ich Frau Rohloff eine Ausnahmegenehmigung für nicht operative Eingriffe und Behandlungen an Mäusen, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen. Es werden folgende Nebenbestimmungen festgelegt:

1. Für den Fall von Verstößen gegen die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes behalte ich mir den Widerruf dieser Genehmigung vor.
2. Die nachträgliche Aufnahme, Änderung und Ergänzung von Nebenbestimmungen behalte ich mir vor. Insbesondere können zusätzliche Auflagen hinsichtlich der nicht operativen Eingriffe gemacht werden.
3. Diese Genehmigung ist für den Zeitraum des Hochschulstudiums von Frau Rohloff an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster befristet.

I. Begründung

Mit Schreiben vom 12.12.2012 haben Sie einen Antrag nach § 9 Abs.1 Satz 4 TierSchG für die Durchführung nicht operativer Eingriffe an Mäusen, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen für Frau Rohloff gestellt und entsprechende Nachweise übersandt.

Nach § 9 Abs. 1 Satz 1 Tierschutzgesetz dürfen Tierversuche nur von Personen durchgeführt werden, die die dafür erforderlichen Fachkenntnisse haben. Tierversuche an Wirbeltieren, ausgenommen Versuche nach § 8 Abs. 7 Nr. 2, dürfen nur von besonders qualifizierten Personen durchgeführt werden.

Frau Rohloff verfügt über kein abgeschlossenes Hochschulstudium; die Voraussetzungen nach

Konten der Stadtkasse

Sparkasse Münsterland Ost
Commerzbank Münster
Postbank Dortmund
SEB
Bankhaus Lampe Münster

Kto.-Nr. 752
Kto.-Nr. 993 210 000
Kto.-Nr. 21 1 38 461
Kto.-Nr. 1 010 305 160
Kto.-Nr. 306 062

(BLZ 400 501 50)
(BLZ 400 409 28)
(BLZ 440 100 46)
(BLZ 400 101 11)
(BLZ 480 201 51)

IBAN: DE1040050150000000752, BIC/SWIFT: WELADED1MST
Deutsche Bank Münster
Deutsche Bundesbank
Volksbank Münster eG
WestLB AG

Kto.-Nr. 0470 005
Kto.-Nr. 4000 1700
Kto.-Nr. 4 200 500
Kto.-Nr. 61 226

(BLZ 400 700 80)
(BLZ 400 000 00)
(BLZ 401 000 50)
(BLZ 300 500 00)

Zentrale Verbindungen

Hauptvermittlung (0251) 492-0
Telefax (0251) 492-7700
Stadtverwaltung@stadt-muenster.de
www.muenster.de/stadt

- 2 -

§ 9 Abs. 1 Satz 1 TierSchG liegen damit nicht vor.

Liegt eine besondere berufliche Qualifikation nicht vor, kann die Behörde Ausnahmen nach § 9 Abs. 1 Satz 4 TierSchG zulassen, wenn der Nachweis der erforderlichen Fachkenntnisse auf andere Weise erbracht ist.

Aufgrund der mir vorliegenden Bescheinigung über einen erfolgreich abgeschlossenen Kursus für Versuchstierkunde

in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster im Sommersemester 2012 vom 05.06.2012

des Max-Planck-Instituts für molekulare Biomedizin vom

und einer Semesterbescheinigung der WWU Münster vom 25.10.12 als Studentin der Medizin kann ich Frau Rohloff für tierexperimentelle Tätigkeiten ohne operative Eingriffe an Mäusen, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen die nach dem Tierschutzgesetz erforderliche Sachkunde anerkennen.

Der Widerrufsvorbehalt wurde auf der Grundlage des § 36 Abs. 2 Verwaltungsverfahrensgesetz erlassen. Damit wird bezweckt, dass aus Gründen des Tierschutzes diese Genehmigung entschädigungslos widerrufen und so Verstößen gegen das Tierschutzgesetz wirksam begegnet werden kann. Nach Abwägung Ihres Interesses an einer uneingeschränkten Erlaubnis und dem öffentlichen Interesse an der Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes halte ich es für verhältnismäßig und zweckmäßig, durch die Widerrufsvorbehalt sicherzustellen, dass die gesetzlichen Voraussetzungen, die bei der Erteilung der Erlaubnis vorliegen müssen, auch zukünftig eingehalten werden.

Eine Befristung für den Zeitraum des Hochschulstudiums der Medizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster ist gerechtfertigt, da nur in diesem Zusammenhang eine weitere Überprüfung der Voraussetzungen für den nicht operativen Sachkundenachweis durch die hiesige Behörde erfolgen kann.

II. Gebührenfestsetzung

Die Erteilung dieser Genehmigung ist gemäß § 8 Abs. 1 Nr. 2 des Gebührengesetzes für das Land Nordrhein-Westfalen (GebG NRW) in der Fassung der Bekanntmachung vom 23.08.1999 kostenfrei. Auf die Erstattung der entstandenen Auslagen wird verzichtet.

III. Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diesen Bescheid können Sie innerhalb eines Monats, nachdem Ihnen der Bescheid bekanntgegeben worden ist, beim Verwaltungsgericht in Münster (Postanschrift: Postfach 8048, 48043 Münster / Hausanschrift: Piusallee 38, 48147 Münster) schriftlich oder zur Niederschrift des Urkundsbeamten der Geschäftsstelle Klage erheben.

Den Antrag können Sie auch elektronisch und mit qualifizierter elektronischer Signatur über das Elektronische Gerichts- und Verwaltungspostfach (EGVP) beim Verwaltungsgericht Münster einreichen. Die Anforderungen an den elektronischen Rechtsverkehr sind in der Verordnung über den elektronischen Schriftverkehr bei den Verwaltungsgerichten und den Finanzgerichten im Lande Nordrhein-Westfalen vom 01.12.2010 in der aktuellen Fassung geregelt.

IV. Hinweis

Die bzw. der Tierschutzbeauftragte ist über die Ausnahmegenehmigung zu informieren.

Im Auftrag



Dr. Serra
Städt. Oberveterinärarzt

1 Durchschrift für Frau Nadine ROHLOFF