

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik für Augenheilkunde

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med Nicole Eter

**Der Effekt von Pioglitazon auf die Immunmodulation in  
einem laserinduzierten Modell der choroidalen  
Neovaskularisation**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae  
der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Cordes, Sebastian Carsten

aus Bielefeld  
2019

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Mathias Herrmann

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med Nicole Eter
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med Eric Schulze-Bahr

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.2019

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik für Augenheilkunde  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med Nicole Eter

Referent: Univ.-Prof. Dr. med Nicole Eter  
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med Eric Schulze-Bahr

## **Zusammenfassung**

### **Der Effekt von Pioglitazon auf die Immunmodulation in einem laserinduzierten Modell der choroidalen Neovaskularisation**

Sebastian Carsten Cordes

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist in den Industrieländern die häufigste Ursache für eine Einschränkung des zentralen Sehvermögens. Insbesondere die feuchte Form kann mit Ausbildung choroidaler Neovascularisationen (CNV) zu einem akuten zentralen Verlust der Sehschärfe führen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Einfluss des PPAR $\gamma$ -Agonisten Pioglitazon auf die Immunmodulation in einem Mausmodell der laserinduzierten CNV, der maßgeblichen pathologischen Veränderung der exsudativen Form der AMD. Hierzu wird das Migrationsverhalten von CX3CR1-exprimierenden Immunzellen des Augenhintergrundes untersucht, sowie durchflusszytometrisch die absolute und relative Anzahl von Immunzellen in der Netzhaut und Aderhaut bestimmt. Die Genexpression der an inflammatorischen Vorgängen beteiligten Zytokine wurde relativ quantitativ gemessen.

Auf morphologischer Ebene kann nachgewiesen werden, dass Pioglitazon die Aktivierung und Migration von Mikrogliazellen in einem laserinduzierten Mausmodell der CNV bei AMD inhibiert. Auch finden sich Hinweise, dass Pioglitazon auf Genexpressionsebene Einfluss auf strukturelle Umbauvorgänge des Augenhintergrundes nimmt. Ein wesentlicher Einfluss von Pioglitazon auf die Anzahl an Immunzellen kann nicht festgestellt werden.

Diese Ergebnisse tragen weiter zum Verständnis der Pathogenese der CNV im Rahmen der AMD bei und bieten einen neuen Ansatz zur Beeinflussung der Pathogenese bereits in einem früheren Stadium als bisherige etablierte Therapien.

Weitere Untersuchungen werden nötig sein, um den Einfluss von Pioglitazon auch auf eine langfristige immunmodulatorische, sowie morphologische Wirkung zu klären.

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.2019

## ERKLÄRUNG

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

Der Effekt von Pioglitazon auf die Immunmodulation in  
einem laserinduzierten Modell der choroidalen  
Neovaskularisation

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

Klinik für Augenheilkunde – Universitätsklinikum Münster

unter der Anleitung von:

Univ.-Prof. Dr. med Nicole Eter

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.

Münster, 04.02.2019

Ort, Datum

Sebastian Cordes/

Name/ Unterschrift

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Grundlagen</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Anatomie und Physiologie des hinteren Augenabschnittes</b> .....	<b>3</b>
2.1.1 Retina .....	3
2.1.1.1 Photorezeptoren und Verschaltung .....	3
2.1.1.2 Das retinale Pigmentepithel (RPE) .....	4
2.1.2 Choroidea .....	5
2.1.2.1 Die Bruchsche Membran .....	5
2.1.2.2 Lamina Choriokapillaris und Lamina Vasculosa .....	5
<b>2.2 Das Immunsystem des Auges</b> .....	<b>6</b>
<b>2.3 Die altersabhängige Makuladegeneration</b> .....	<b>8</b>
2.3.1 Definition und Erstbeschreibung .....	8
2.3.2 Epidemiologie .....	8
2.3.3 Risikofaktoren .....	9
2.3.4 Klinische Erscheinungsformen .....	10
2.3.5 Pathogenese .....	12
2.3.6 Diagnose .....	16
2.3.7 Therapie .....	18
<b>2.4 Grundlagen zur Herleitung des Mausmodells</b> .....	<b>20</b>
2.4.1 CX3CR1-Fraktalkin-Rezeptor .....	20
2.4.2 CX3CR1-knock-in-Mäuse .....	20
2.4.3 PPAR $\gamma$ -Rezeptor .....	20
2.4.4 Pioglitazon .....	22
2.4.5 Zytokine und Wachstumsfaktoren .....	23
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1 Vorgehen</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2 Vorbereitung der durchflusszytometrischen Untersuchungen</b> .....	<b>26</b>
<b>3.3 Vorversuch durchflusszytometrische Messung in-vitro</b> .....	<b>27</b>
<b>3.4 Mausmodell</b> .....	<b>29</b>
3.4.1 Ansatz Pioglitazon-Methylcellulose-Suspension .....	30
3.4.2 Vorbereitung der Mäuse .....	30
3.4.3 In-vivo Autofluoreszenz .....	31
3.4.4 Ex-vivo-Messungen: RT-PCR und Durchflusszytometrie .....	33
3.4.4.1 Gewinnung der murinen Retina und Choroidea .....	34
3.4.4.2 Ex-vivo RT-PCR .....	34
3.4.4.3 Ex-vivo Durchflusszytometrie .....	37
<b>3.5 Empirische Methode</b> .....	<b>40</b>
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1 In-vitro Durchflusszytometrie</b> .....	<b>42</b>
<b>4.2 Ex-vivo Durchflusszytometrie</b> .....	<b>45</b>
4.2.1 Kontrolle des Modells .....	45
4.2.2 Pioglitazon- und Celluloseapplikation .....	53
<b>4.3 Ex-vivo Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)</b> .....	<b>57</b>
4.3.1 Auswirkung der Laserbehandlung .....	57
4.3.2 Beeinflussung der Expression durch Pioglitazon .....	58
<b>4.4 In-vivo Autofluoreszenzuntersuchungen</b> .....	<b>66</b>
<b>5 Diskussion</b> .....	<b>72</b>

5.1 Interpretation der Ergebnisse.....	72
5.2 Limitationen des Modells.....	77
5.3 Zusammenfassung.....	79
I. Literaturverzeichnis .....	82
II. Abbildungsverzeichnis .....	97
III. Tabellenverzeichnis .....	99
IV. Abkürzungen .....	99
V. Lebenslauf.....	102
VI. Anhang.....	I

# 1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Rolle von Immunzellen und Zytokinen in einem Mausmodell der laserinduzierten choroidalen Neovaskularisation (CNV) und dem Einfluss des Thiazolidinedions Pioglitazon, einem PPAR $\gamma$ -Agonisten, auf diese Zytokine sowie das Migrationsverhalten und die Anzahl der Immunzellen. Die CNV ist die zentrale pathologische Veränderung bei der exsudativen Form der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) [14]. Unter AMD versteht man eine chronische progrediente Erkrankung des zentralen Augenhintergrundes, welche in den Industrieländern die häufigste Ursache für eine Einschränkung des zentralen Sehvermögens ist [30, 72]. Somit ist die AMD eine Erkrankung von großer gesellschaftlicher Relevanz. In bisherigen Studien konnten Hinweise gefunden werden, dass die Entwicklung der CNV im Rahmen der AMD von entzündlichen und immunologischen Vorgängen beeinflusst wird [5]. Dies führt zu der Annahme, dass sich die Pathogenese der CNV durch einen Eingriff in immunologische Vorgänge beeinflussen lässt. Im Rahmen dieser Arbeit wird diese Hypothese durch den Einsatz eines immunmodulatorischen Medikamentes weiter geprüft.

In vorangegangenen Studien zeigte sich eine antiinflammatorische und immunmodulierende Wirkung von Pioglitazon in neovaskulären und immunologisch vermittelten Krankheitsmodellen, welche in diesem CNV-Modell auf die an diesen Vorgängen beteiligten Immunzellen untersucht wurde, um eine mögliche therapeutische Anwendung dieser Substanz zu eruieren [22, 141]. Hierbei wurde zunächst in der Zellkultur der Einfluss von Pioglitazon auf die absolute Zellzahl einer Population von primären humanen retinalen Endothelzellen untersucht und durchflusszytometrisch der Anteil an lebenden und toten Zellen bestimmt. Anschließend wurde in der lebenden Maus das Migrationsverhalten von CX3CR1-exprimierenden Immunzellen des Augenhintergrundes untersucht, sowie in ex-vivo-Versuchen die absolute und relative Anzahl dieser Zellen in der Netzhaut und Aderhaut bestimmt. Die Genexpression der an inflammatorischen Vorgängen beteiligten Zytokine wurde relativ quantitativ gemessen.

Im Einzelnen wurden folgende Aspekte untersucht:

- Messung der Proliferation und Apoptose humaner retinaler Endothelzellen unter Einfluss von Pioglitazon in-vitro
- Autofluoreszenz-Darstellung von Anordnung und Migration CX3CR1-positiver Zellen am Fundus gelaserter und Pioglitazon-behandelter Mäuse

- Durchflusszytometrische Differenzierung von Immunzellen in Retina und Choroidea gelaserter und Pioglitazon-behandelter Mäuseaugen
- Messung der Genexpression verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren in Retina und Choroidea gelaserter und Pioglitazon-behandelter Mäuseaugen

## **2 Grundlagen**

### **2.1 Anatomie und Physiologie des hinteren Augenabschnittes**

Der hintere Augenabschnitt beinhaltet die Retina (Netzhaut) und Choroidea (Aderhaut). In der Retina finden sich die den Lichtreiz aufnehmenden Sinneszellen und Neurone, welche die Sehinformation verarbeiten und an die Sehzentren des Gehirns weiterleiten [49]. Entwicklungsgeschichtlich und funktionell zählt die Retina als vorgeschobener Anteil des zentralen Nervensystems [49]. Die Choroidea dient der Ernährung der Photorezeptoren und der Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur des Auges [49].

#### **2.1.1 Retina**

##### **2.1.1.1 Photorezeptoren und Verschaltung**

Fällt ein Lichtreiz in die Retina ein, so durchdringt er die Netzhaut von innen nach außen, also zunächst die Schicht der Ganglienzellen und die der Bipolarzellen, um dann von den Photorezeptoren (entspricht dem 1. Neuron) in ein neuronales Signal umgewandelt zu werden [49, 132]. Diese enthalten aneinandergereihte, münzähnliche Scheiben (Disci), in welchen Moleküle des Sehfärbstoffes enthalten sind [132]. Diese absorbieren Photonen und erfahren dadurch einen Umbau, wodurch eine Hyperpolarisation induziert wird, was einen veränderten Ruhestrom der Photorezeptoren bewirkt [132]. Dieses Signal wird über die Bipolarzellen (2. Neuron) und Zwischenverschaltungen (amakrine Zellen und Horizontalzellen) den Ganglienzellen (3. Neuron) zugeleitet [49, 132]. An der Papille werden die Axone dieser Ganglienzellen gebündelt und verlaufen als Nervus Opticus zu den Sehzentren des Gehirns [49]. Die Neuroretina wird, mit Ausnahme der Außensegmente der Photorezeptoren, durch Äste der Arteria centralis retinae versorgt, welche mit dem Sehnerv in das Auge eintritt [49, 132]. Die Außensegmente erhalten ihre metabolische Versorgung durch aktiven Transport über das Pigmentepithel aus den Gefäßen der Choriokapillaris [132].

Bei den Photorezeptoren wird zwischen zwei Arten unterschieden [132]. Die Stäbchen befinden sich vor allem in der Peripherie der Netzhaut und sind beim Dämmerungs- und Nachtsehen aktiv, wohingegen sich die Zapfen, welche in drei Unterformen existieren und das trichromatische Farbsehen und Tagessehen ermöglichen, vor allem im Zentrum der Retina finden [49]. Dieser zentrale Bereich der menschlichen Retina wird als Makula

lutea oder gelber Fleck bezeichnet und enthält die höchste Dichte an Zapfen [49]. Sie hat einen Durchmesser von ca. 5,5 mm [132]. In dessen Zentrum wiederum findet sich die Fovea centralis, eine gefäßfreie, grubenförmige Einsenkung [49]. Die Grube selbst (Foveola) hat einen Durchmesser von ca. 0,35mm und enthält ausschließlich Zapfen und weist mit 150.000 bis 180.000 Zapfen/mm<sup>2</sup> die höchste Dichte dieser Rezeptoren auf [49, 67, 132]. Die Zapfen der Fovea sind im Gegensatz zu denen der Peripherie im Verhältnis von 1:1:1 mit den Bipolarzellen und Ganglienzellen verschaltet. Diese enge Anordnung ist Grundlage für das hohe Auflösungsvermögen des Auges [132].

Bei einem Untergang von Zapfen kommt es entsprechend ihrer physiologischen Funktionen zu diversen Ausfällen [49]. Dies beinhaltet vor allem Zentralskotome, eine herabgesetzte zentrale Sehschärfe, Metamorphopsien, Störungen der zentralen Lichtunterschieds- und Farbunterschiedlichkeitsempfindung mit Photophobie und ausgeprägter Blendungsempfindlichkeit, sowie ein verringertes Kontrastsehen [132].

### **2.1.1.2 Das retinale Pigmentepithel (RPE)**

Die Photorezeptoren sind in der Lage die Disci, in welchen der photochemische Prozess abläuft, zu regenerieren [132]. Das RPE ist eine einfache Schicht hexagonaler Zellen, welche direkt an die Photorezeptoren angrenzt [132]. Ältere Disci (Photorezeptoraußensegmente) der Photorezeptoren werden zum RPE hin abgestoßen und von diesem phagozytiert [132]. Die Abbauprodukte werden regeneriert und den Photorezeptoren zugeführt oder in die Choriokapillaris abgestoßen [132]. Die metabolische Versorgung der Photorezeptoren erfolgt durch aktiven Transport von Metaboliten durch das RPE hindurch, welches mit seiner Funktionsweise die äußere Blut-Retina-Schranke bildet [14, 132]. Die RPE-Zellen enthalten melaningefüllte Granula, die vor allem Licht der Wellenlänge zwischen 400 und 800nm absorbieren, wodurch der Anteil des Streulichtes und des reflektierten Lichtes bedeutend reduziert wird [132]. Dies verhindert das Verarbeiten fälschlicher optischer Informationen in den Rezeptorzellen [132].

Die Funktionen des RPEs können also als Absorption von Streulicht, metabolische Versorgung der Photorezeptorzellen, sowie Aufrechterhaltung der äußeren Blut-Retina-Schranke zusammengefasst werden [132]. Übersteigt mit dem Alter das Aufkommen an zu metabolisierenden Produkten die Kapazitäten des RPE, so werden Abbauprodukte als Lipofuscin im RPE oder Drusen in der Bruchschens Membran abgelagert [132].

Auch wenn die neurosensorische Retina und das RPE direkt aneinander angrenzen, so besteht doch keine anatomische Verbindung zwischen ihnen [132]. Dazwischen befindet sich mukopolysaccharidhaltige Interzellulärschicht (subretinaler Raum) [132]. Pathologische Prozesse können leicht zu einer Trennung der beiden Schichten führen [132]. Das zeigt sich zum Beispiel bei subretinalen Blutungen oder einer Amotio retinae [132].

Das RPE produziert und sezerniert diverse Zytokine und Wachstumsfaktoren wie unter anderem IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und VEGF [2, 60]. Direkt an das RPE schließt sich die Bruchsche Membran an [132].

## **2.1.2 Choroidea**

### **2.1.2.1 Die Bruchsche Membran**

Die etwa 2-4 $\mu$ m dicke Bruchsche Membran oder Lamina elastica ist zwischen dem retinalen Pigmentepithel und der Lamina Choriokapillaris gelegen [110]. Die Bruchsche Membran ist eine aus kollagenen und elastischen Fasern aufgebaute extrazelluläre Matrix, welche als physikalische und biochemische Barriere den Austausch zwischen RPE und Choriokapillaris reguliert [14, 61]. Hierdurch wird auch die Migration von Zellen zwischen Retina und Choroidea stark eingeschränkt [14]. Da die Bruchsche Membran eine azelluläre Schicht ist, erfolgt Stoffaustausch durch sie hindurch vornehmlich in Form von passiver Diffusion [133]. Mit zunehmendem Alter unterliegt die Bruchsche Membran zahlreichen Veränderungen, welche eine Verdickung dieser Schicht bewirken [53, 61, 132]. Eine erhöhte Quervernetzung der Kollagenfasern, zunehmende Kalzifikation elastischer Anteile, sowie Einlagerung von Lipiden führen zu einer Veränderung der Diffusionseigenschaften, wodurch die Fähigkeit des RPE eingeschränkt wird, Stoffwechselprodukte und Flüssigkeiten durch die Bruchsche Membran hindurch zu transportieren [14, 92, 132, 133]. Dies führt unter anderem zu einer Akkumulation von Stoffwechselprodukten in und an der Bruchschen Membran [14, 53, 132].

### **2.1.2.2 Lamina Choriokapillaris und Lamina Vasculosa**

Ein Geflecht an fenestrierten Kapillaren mit zahlreichen Anastomosen bildet die Lamina Choriokapillaris, welche vor allem die Rezeptoren der äußeren Netzhautschicht versorgt [14, 49]. Nach außen hin schließt sich die Lamina Vasculosa mit ihren hauptsächlich

venösen Gefäßen an [49]. Das Gefäßsystem der Choroidea hat ein deutlich höheres Blutvolumen als es zur rein metabolischen Versorgung der Retina notwendig wäre [49], [14]. Dies erklärt sich an der Funktion der Choroidea als Wärmeregulator für die ablaufenden photochemischen Prozesse [14, 49]. Auch die Choriokapillaris unterliegt mit zunehmendem Alter Veränderungen, welche zu einer verminderten Dichte und Durchmesser der Gefäße und somit einem verringerten Blutfluss führen [51, 89].

## **2.2 Das Immunsystem des Auges**

Da es der sensorischen Neuroretina nicht möglich ist zerstörte Zellen zu ersetzen, können bereits kleinere Veränderungen an den für die zentrale Sehschärfe notwendigen Strukturen zu beträchtlichen Funktionsverlusten führen [137]. Ursache können die Folgen einer Entzündungsreaktion des hinteren Augenabschnittes sein, weshalb das Auge einerseits gegen Pathogene geschützt sein muss, andererseits jedoch auch vor den Folgen einer überschießenden Immunreaktion [1, 137]. Die Retina ist ein sogenanntes immunprivilegiertes Gewebe [1]. Durch die Blut-Retina-Schranke unterliegt sie nicht den gleichen Entzündungsvorgängen, wie sie in anderen Organen anzutreffen sind [1, 137]. Deren tight junctions erschweren es Pathogenen, über das Blut in das Auge zu gelangen [137]. Doch auch der Eintritt von körpereigenen Immunzellen wird in weiten Teilen verhindert [132, 137]. Innerhalb dieser Umgebung werden durch die Bildung einer immunsuppressiven Mikroumgebung Entzündungsvorgänge auf ein Minimum begrenzt [137]. So kann verhindert werden, dass überschießende, immunzellvermittelte Antworten auf akute Entzündungen oder Schäden zu einer konsekutiven Schädigung nicht erneuerbaren Nervengewebes führen [1, 137].

Die Retina besitzt eigene, residente Immunzellen, die Mikrogliazellen [1]. Diese werden den Monozyten zugeordnet und stammen von primitiven Makrophagen ab, welche während der Entwicklung der Retina in diese einwandern, sich zu Mikrogliazellen differenzieren und gleichmäßig verteilen [1, 63]. So findet man die Mikrogliazellen in der reifen Retina geschichtet in der inneren und äußeren plexiformen Schicht [63]. Unter Normalbedingungen befinden sich Mikrogliazellen in einem ruhenden, oder besser überwachenden Zustand [1, 97]. Sie kontrollieren und erhalten die Homöostase des Gewebes [1]. Beim Auftreten einer inflammatorischen Reaktion werden die Mikrogliazellen aktiviert [1]. Es finden sich Hinweise, dass die permanente Aktivierung der Mikrogliazellen im Rahmen von chronischen entzündlichen oder degenerativen

Veränderungen selbst eine schädigende Wirkung auf die sensiblen Strukturen der Retina ausübt [1].

## **2.3 Die altersabhängige Makuladegeneration**

### **2.3.1 Definition und Erstbeschreibung**

Unter „altersabhängiger Makuladegeneration“ versteht man eine chronische progrediente Erkrankung des zentralen Augenhintergrundes, welche durch ein Zusammenspiel verschiedener Pathologien der Netzhaut, Aderhaut und des Pigmentepithels zu einer voranschreitenden Degeneration der Makula lutea, dem Punkt des schärfsten Sehens, und zu einem Funktionsverlust der betroffenen Strukturen führt [16, 30, 35, 61, 65].

Die erste Erwähnung der disciformen, feuchten Form der AMD findet sich in Pagenstechers „Atlas der pathologischen Anatomie des Augapfels“ von 1875 [100]. Blutgefäße zwischen dem RPE und der Bruchschen Membran wurden erstmals 1876 von Sattler beschrieben [119]. 1985 setzte Otto Haab diese Erkrankung mit dem Begriff „senile Makuladegeneration“ erstmals mit fortschreitendem Alter in Verbindung [54]. Der Begriff der „disciformen Degeneration“ wurde 1905 von Oeller, sowie 1926 von Junius und Kuhnt etabliert [50, 69]. Auf Grund unterschiedlicher Bezeichnungen verschiedener Ausprägungen der Erkrankung war eine einheitliche Diagnose der Erkrankung lange jedoch nicht möglich [16]. 1995 wurde von Bird et al. ein Klassifizierungs- und Bewertungssystem vorgestellt, welches zu großen Teilen auf dem vier Jahre früher erschienen „Wisconsin Age-Related Maculopathy Grading System“ basiert [16, 61, 73]. Hierdurch wurde es ermöglicht, die AMD nach objektiven Parametern zu diagnostizieren und in Stadien einzuteilen [61, 73].

### **2.3.2 Epidemiologie**

Die AMD ist in den Industrieländern die häufigste Ursache für eine Einschränkung des zentralen Sehvermögens, welche bis hin zur Blindheit führen kann [72, 91, 132].

Studien zur Prävalenz wurden in verschiedenen Teilen der Welt durchgeführt und wiesen in Abhängigkeit von der untersuchten Population teilweise erhebliche Schwankungen auf [72, 91]. So ist die Prävalenz in Afrikanischen Populationen deutlich geringer als in Populationen von Kaukasiern [72]. Allen Studien gemeinsam war jedoch, dass sowohl die frühe als auch die späte Form der AMD eine starke positive Korrelation zum Lebensalter der untersuchten Personen aufzeigten [72, 127, 146].

Die Prävalenz einer frühen altersabhängigen Makulopathie, welche sich zu einer manifesten AMD entwickeln kann, wird in der Altersgruppe 55-64 Jahre, je nach Studie und Population, auf etwa 14% geschätzt [61, 72, 91]. In der Altersgruppe 65-74 Jahre wird diese Prävalenz auf etwa 18% geschätzt, in der Altersgruppe der über 75-jährigen liegt sie bereits bei etwa 30% [61, 72, 91].

Die Prävalenz der späten AMD beträgt in den gleichen Altersgruppen etwa 0,6% beziehungsweise 1,4% und 7,1% [61, 72, 91]. Auf Grund der Zunahme des durchschnittlichen Lebensalters, sowie der demografischen Entwicklung ist von einer deutlichen Zunahme der Anzahl der an einer AMD Erkrankten zu rechnen [61].

### **2.3.3 Risikofaktoren**

Es wird vermutet, dass die Entstehung der AMD auf einem Zusammenspiel genetischer Einflüsse und externer Umwelteinflüsse beruht [35].

Der einzige eindeutig belegbare externe Risikofaktor sowohl für das Auftreten der Früh- als auch der Spätformen ist das Rauchen [127]. Durch oxidative Schäden, vermehrte Ischämie und Hypoxie sowie Mikroinfarkte wird ein Anreiz zur Entstehung einer CNV gesetzt [61, 77].

Als weitere potentielle externe Risikofaktoren wurden unter anderem ein erhöhter BMI, Diabetes mellitus, eine arterielle Hypertonie, eine vorangegangene Kataraktchirurgie, und eine helle Irisfarbe diskutiert [18, 47, 127]. Diese Theorien konnten in Studien jedoch nicht eindeutig reproduzierbar bestätigt werden [18, 47, 128]. Lediglich eine ausgedehnte Sonnenexposition kann laut der Beaver-Dam-Eye-Study ebenfalls als Risikofaktor für die Frühform der Erkrankung angesehen werden [146].

In der ARED-Studie des National Eye Institute konnten Antioxidantien wie Zink,  $\beta$ -Carotin, Vitamin C und E sowie Omega-3-Fettsäuren als protektive Faktoren ausgemacht werden [7, 39, 61, 116].

Die wichtigsten Risikofaktoren sind jedoch das Alter und eine positive Familienanamnese [39]. Es wurden bereits diverse Genvarianten identifiziert, welche sich als Risikofaktor oder auch protektiver Faktor erwiesen haben. Für das APOE-e4-Allel des Apolipoprotein-E-Gens konnte eine Assoziation mit einem verringerten Erkrankungsrisiko festgestellt werden, wohingegen das Allel APOE-e2 mit einem erhöhten Risiko einhergeht [120].

Als weiteres Beispiel für ein erhöhtes Risiko sind unter anderem Polymorphismen des CFH-Gens auf dem langen Arm des Chromosoms 1, welches für den Komplementfaktor H kodiert, zu nennen [56, 74]. Dies konnte bereits in mehreren Studien in unterschiedlichen Populationen bestätigt werden [56, 74]. Auch für die Gene der Komplementfaktoren C2 und B, Proteinen der Komplement-Kaskade, konnten Polymorphismen identifiziert werden, welche mit einem erhöhten AMD-Risiko einhergehen [48].

Für die neovaskuläre Form der AMD konnte durch Cheng et al. gezeigt werden, dass eine deutliche Assoziation von Polymorphismen des ARMS2-Gens und der Entstehung einer neovaskulären AMD besteht [26].

### **2.3.4 Klinische Erscheinungsformen**

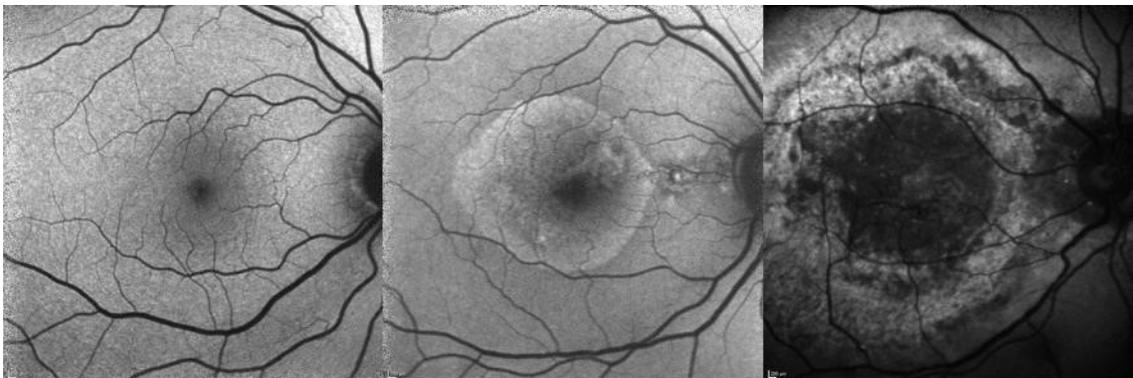
Die Einschränkung, die ein Patient durch die AMD erlebt, ist stark abhängig vom Stadium und der Form der Erkrankung [35, 61]. In der Mehrzahl der Fälle tritt die Erkrankung bilateral auf und weist eine Symmetrie der Veränderungen an beiden Augen auf [11]. Beim Spätstadium kann zwischen trockenen und feuchten Veränderungen unterschieden werden [35].

Im Frühstadium der Erkrankung, welches meist trocken ist, sind in der ophthalmoskopischen Untersuchung Unregelmäßigkeiten des RPE zu finden, welche als Hyper- oder Hypopigmentierungen imponieren, sowie Drusen, welche sich als gelblich-weiße subretinale Verdickungen zeigen [35]. Drusen sind Anhäufungen von Abbauprodukten des RPE-Stoffwechsels im Bereich der Bruchschens Membran [35, 53]. Sie können bei diversen Erkrankungen des Augenhintergrundes auftreten und sind somit nicht pathognomonisch für die AMD, vor allem weiche Drusen stellen jedoch wichtige prognostische Faktoren für die AMD dar [14, 35].

Bei Patienten mit dem Frühstadium der Krankheit finden sich häufig sehr gute Werte in der Sehschärfeprüfung [61, 65, 122, 140]. Es kann jedoch gelegentlich von Problemen beim Lesen mit schwacher Beleuchtung, bei der Dunkeladaptation und beim Autofahren in der Dunkelheit berichtet werden, was durch Standarduntersuchungen nicht erfasst wird [65, 140].

Die Ursache für die teilweise erheblichen zentralen Sehvermindierungen findet sich jedoch in den Spätstadien der AMD [139]. Diese kann klinisch in die trockene und feuchte AMD unterteilt werden, welche auch ineinander übergehen können [65, 139].

Zusammen mit dem Bild eines gesunden Auges sind beide Formen in Abbildung 1<sup>1</sup> dargestellt.



**Abbildung 1: gesundes Auge einer 16-jährigen Frau, geographische Atrophie im Auge eines 72-jährigen Mannes und CNV im Auge einer 82-jährigen Frau (von links nach rechts)**

Die trockene oder nicht-exsudative Form ist charakterisiert durch eine (geographische) Atrophie des RPE, wobei im weiteren Verlauf hierbei auch die Choriokapillaris und die Neuroretina mit ihren Photorezeptoren betroffen sein können [35, 139, 140].

Die feuchte oder exsudative Form zeichnet sich durch neovaskuläre Veränderungen aus, welche im Verlauf auch zu Pigmentepithelabhebungen, Blutungen und Narben führen können [35, 139].

Die geographische Atrophie, welche für etwa 1/5 der zentralen Sehschärfeverluste ursächlich ist, entwickelt sich üblicherweise langsam über viele Jahre [139, 140]. Die zunächst meist extrafovealen Areale dehnen sich aus, konfluieren und beziehen erst später die Fovea mit ein [139, 140]. Somit verläuft die Erkrankung oft über viele Jahre klinisch unauffällig [138, 140]. Ist die Fovea jedoch mit betroffen, kommt es zu einer deutlichen Visusminderung [138, 140]. Bereits früher kann es durch die zunächst meist perifoveale Lokalisation zu Skotomen kommen [65, 140]. Diese werden zu Beginn jedoch nicht immer wahrgenommen und können teilweise kompensiert werden [65, 138].

Die häufigste Ursache für den akuten zentralen Verlust der Sehschärfe stellt die CNV dar [139]. Hierbei kommt es zur Einsprossung neugebildeter Kapillaren aus der Choroidea durch die Bruchsche-Membran hindurch und unter das RPE [50, 61, 117]. Diese neuen, unreifen Gefäße weisen teilweise eine erhöhte Permeabilität auf [117, 131]. Blutungen und Leckagen führen zu Makulaödem und Blutansammlungen, durch welche das RPE abgehoben oder zerstört wird [59, 61]. Klinische Symptome sind unter

---

<sup>1</sup> Abbildungen mit freundlicher Genehmigung der Universitätsaugenklinik Münster

anderem Metamorphopsien und Verschwommensehen [30, 35, 61]. Teilweise kann es durch plötzliches Reißen des RPEs oder Leckagen und Blutungen zu einer akuten Sehverschlechterung kommen [35, 50, 61]. Diese akuten Symptome treten zumeist erst an einem Auge auf, auch wenn häufig bereits beide Augen Pathologien aufweisen [30, 86].

Mit der Zeit führen Exsudationen, Blutungen, Gefäßproliferationen und die Invasion von Entzündungszellen und Fibroblasten zur Narbenbildung mit Untergang der neuralen und retinalen Strukturen [35]. In diesem Stadium ist meist kein Lesevisus mehr vorhanden und auch durch Therapie keine Visusverbesserung mehr zu erwarten [35].

### **2.3.5 Pathogenese**

Auch wenn die Pathogenese dieser Erkrankung noch nicht vollständig geklärt ist, so konnten doch bereits diverse Komponenten der Krankheitsentstehung identifiziert werden [5, 59]. Die Basis der Erkrankung wird durch die altersbedingten Veränderungen der äußeren Netzhautschichten, der Bruchschens Membran und der Aderhaut gelegt [6, 14, 59]. In diesem Bereich findet ein reger Stoffaustausch statt, welcher bei Störungen zu Ablagerungen führt [6, 30, 59, 61]. Mit zunehmendem Alter verringert sich die Anzahl und Dichte der postmitotischen RPE-Zellen, was zu einer erhöhten metabolischen Belastung und Funktionseinschränkung des lysosomalen Abbaus in den verbliebenen Zellen führt [30]. Die Akkumulation unvollständig abgebauter Stoffwechselprodukte begünstigt eine chronische Entzündung, was zusammen mit der höheren metabolischen Belastung zu einer Beeinträchtigung der choroidalen Kapillaren führt und in einer hypoxischen Umgebung resultiert [30, 59, 110].

Auch der Melaningehalt der RPE-Zellen nimmt mit dem Alter ab [59]. Dies verringert die Fähigkeit des RPE, Streulichtphänomene zu reduzieren und freie Radikale abzufangen [126].

Die Bruchsche-Membran verdickt sich mit dem Alter diffus, außerdem kommt es zu Kalzifikationen, Lipid-, Glykoprotein- und Proteinablagerungen und einem Umbau von elastischen und kollagenen Fasern [14, 53]. Hiermit geht eine Abnahme der Elastizität und eine Zunahme des Diffusionswiderstandes einher [14, 92]. Der metabolische Austausch zwischen RPE und Choriokapillaris wird hierdurch weiter erschwert [92]. Auch der mit dem Alter abnehmende Gefäßdurchmesser und die geringere Anzahl choroidaler Kapillaren spielen hierbei eine Rolle [51, 89].

Die Ablagerungen im Bereich der Bruchschens Membran führen zur Bildung der für die trockene AMD charakteristischen weichen Drusen [14]. Findet im Verlauf ein weiterer Untergang von RPE-Zellen statt, beginnen die darüberliegenden Photorezeptoren zu degenerieren [14]. Degeneration von RPE und Photorezeptoren beginnt meist parafoveal und formiert sich hufeisenförmig um die Fovea herum [138]. In den Randbereichen dieser meist scharf begrenzten geographischen Atrophie finden sich Hyperpigmentationen infolge phagozytierten Melanins und Lipofuscins [14]. Auf Grund der Degeneration der darüber liegenden Schichten sind in der Funduskopie verstärkt choroidale Gefäße sichtbar [61].

Für die Entstehung der feuchten Form ist eine Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung proangiogener Faktoren innerhalb des Retina-RPE-Choroidea-Komplexes ursächlich [35, 98, 125]. Das Hauptaugenmerk liegt hierbei auf VEGF (vascular endothelial growth factor) als den das Gefäßwachstum induzierenden Faktor, sowie PEDF (pigment epithelium-derived factor) als den das Gefäßwachstum hemmenden Faktor [5]. VEGF wird unter anderem von retinalen Pigmentepithelzellen und Makrophagen gebildet, mögliche weitere Quellen des VEGF sind noch unzureichend geklärt und Gegenstand der aktueller Studien [2, 75].

Es gibt mehrere Hypothesen bezüglich der Pathogenese der CNV, wobei sich die tatsächlichen Ursachen wahrscheinlich aus einem Zusammenkommen der verschiedenen Komponenten ergeben [5, 35].

Zunächst ist die Diffusionskapazität der Bruchschens Membran zu betrachten. Nimmt diese in Folge altersabhängiger Veränderungen ab, ist es möglich, dass auch die Diffusion von Wachstumsfaktoren in die Aderhaut zunehmend erschwert wird [35, 92]. Zusätzlich wird VEGF in den Ablagerungen in und an der Bruchschens Membran gebunden [14]. Die verminderte Durchlässigkeit der Bruchschens Membran führt zu einer Regression der auf diese Faktoren angewiesenen Choriokapillaris [61]. Die hieraus resultierende Hypoxie wiederum führt zu einer vermehrten Produktion von VEGF, welcher als Stimulus für die CNV wirkt [61, 77, 125, 131].

Ein weiterer Aspekt ist die reduzierte makuläre Blutversorgung bei AMD-Patienten. Im Sinne einer Kompensation könnten verstärkt proangiogene Stimuli produziert werden, allen voran VEGF, was nahe legt, dass eine verringerte foveoläre choroidale Durchblutung das Risiko der Entwicklung einer CNV erhöht [35, 52].

Zudem begünstigt die erhöhte Exposition der Makula gegenüber oxidativem Stress neben der Ansammlung von Lipofuscin in RPE-Zellen auch eine vermehrte VEGF-Expression in den RPE-Zellen [77].

Letztendlich begünstigen diese Wege eine vermehrte Bildung von VEGF und somit eine verstärkte Gefäßneubildung.

Bei der CNV treten Kapillargefäße durch die Bruchsche Membran hindurch [50, 61]. Wachsen die neu gebildeten choroidalen Gefäße in die Bruchsche Membran ein und breiten sich horizontal unterhalb der RPE-Basalmembran aus, spricht man von okkulten CNV [35, 50, 78]. Wird auch die Pigmentepithelzellschicht durchbrochen, wird von der klassischen CNV gesprochen [35, 50, 78]. Mischformen zwischen diesen beiden Formen treten ebenfalls auf [35, 50, 78]. Klinisch unterscheiden kann man diese Formen in der Fluoreszenzangiographie. Die Differenzierung ist ein wichtiger prognostischer Faktor unter anderem auch für den Therapieerfolg einer anti-VEGF-Therapie.

Diese Gefäßneubildungen können durch erhöhte Permeabilität zu Ödemen und Blutungen führen, welche bei Auftreten im Bereich der Fovea einen plötzlichen Visusverlust verursachen können [35, 78]. Im weiteren Verlauf können Abhebungen des Pigmentepithels, sowie Fibrosierungen und Bildung neovaskulärer Membranen mit Ausbildung einer disciformen Narbe und irreversiblen Verlust von neuronalen Strukturen auftreten [35, 61, 78].

Die morphologischen Korrelate der trockenen AMD können die Entstehung der exsudativen AMD begünstigen [6].

Auch finden sich in diversen Studien bedeutende Hinweise darauf, dass immunologische und inflammatorische Vorgänge eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der AMD spielen [90, 102, 104].

Zunächst ist hier das Komplementsystem zu nennen. Eine Aktivierung resultiert in einer proinflammatorischen Reaktion, was unter anderem die Bildung von Chemokinen befördert, welche eine Einwanderung von Entzündungszellen bewirken [149]. Im gesunden Auge ist das Komplementsystem kontinuierlich auf niedrigem Level aktiviert und wird durch Regulatorproteine auf diesem Level gehalten [150]. Im Rahmen der AMD scheint eine Dysregulation, insbesondere eine übermäßige Aktivität des Komplementsystems, die Pathogenese zu beeinflussen [102]. Dies deckt sich mit den Beobachtungen, dass Polymorphismen des CFH-Gens mit einem erhöhten Risiko für AMD einhergehen [56]. CFH wirkt als negativer Regulator für das Komplementsystem, eine Einschränkung seiner Funktion begünstigt somit eine proinflammatorische

Umgebung [102]. Die Veränderungen der jeweiligen Genprodukte sind nicht spezifisch für das Auge, jedoch könnten andauernde, mit Komplementaktivierung einhergehende Entzündungsvorgänge den visusbedrohenden Manifestationen der AMD zu Grunde liegen [123]. Das Regulatorprotein CFH wird sowohl im retinalen Pigmentepithel als auch in der Choroidea exprimiert [55]. In einer Studie zur Komplementaktivierung wurden im Blutplasma an AMD erkrankter Patienten signifikant erhöhte Marker der chronischen Komplementaktivierung gefunden [123]. Darüber hinaus konnten in-vitro-Studien zeigen, dass die CFH-Sekretion durch RPE-Zellen, welche langfristig oxidativem Stress ausgesetzt werden, vermindert wird [24]. Darüber hinaus wird die Aktivität des Komplementsystems unter anderem durch Makrophagen beeinflusst [82].

Makrophagen finden sich in histologischen Proben von Patienten mit AMD, insbesondere in Regionen mit RPE-Atrophie, degenerierter Bruchscher Membran sowie CNV [90, 104]. Die Rolle der Makrophagen in der Pathogenese der AMD konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden, verschiedene Studien kommen zu gegensätzlichen Ergebnissen. Einige Studien legen den Schluss nahe, dass die Rekrutierung von Makrophagen die Ausbildung einer proinflammatorischen Umgebung sowie die Bildung von CNV weiter begünstigt, wohingegen andere Studien, insbesondere im Frühstadium bei der Beseitigung von Ablagerungen an der Bruchschen Membran, einen protektiven Effekt beschreiben [82, 102]. Ein Erklärungsansatz hierzu sind verschiedene Untergruppen von Makrophagen, insbesondere die Untergruppen M1 und M2, wobei M1 vorrangig proinflammatorische Eigenschaften aufweisen, während M2 an Abbauvorgängen, Immunmodulation, Geweberemodellierungen und Angiogenese beteiligt sind [88]. Makrophagen der Untergruppen M1 und M2b konnten in-vitro eine Beeinflussung des RPE zu einer vermehrten Expression von inflammatorischen Zytokinen und Komplementfaktoren nachgewiesen werden [82]. Eine wesentliche Beteiligung von Makrophagen an der Pathogenese der AMD, ob nun förderlich oder inhibierend, scheint unstrittig zu sein.

Eine nicht minder zentrale Rolle nehmen die Mikrogliazellen ein. Diese residenten Immunzellen der Retina werden bei retinaler Schädigung und Auftreten inflammatorischer Reize aus ihrem ruhenden/überwachenden Zustand aktiviert und migrieren vermehrt von der inneren Retina in die äußere, die Photorezeptoren-beherbergende Schicht und akkumulieren hier sowie im subretinalen Raum [1, 102]. Untersuchungen durch Ma et al. konnten zeigen, dass aktivierte retinale Mikrogliazellen Veränderungen der RPE-Zellschicht bewirken [84]. RPE-Zellen reagieren mit einer erhöhten Proliferationsrate sowie einer Veränderung der tight junctions benachbarter

Zellen, was insgesamt in einer weniger organisierten, ungleichmäßigen RPE-Zellschicht resultiert [84]. Darüber hinaus kommt es zu einer erhöhten Expression und Sekretion von proinflammatorischen, chemotaktischen und proangiogenen Proteinen, sowie einer größeren Ausdehnung von CNV im subretinalen Raum [84]. Auch konnte gezeigt werden, dass die gezielte subretinale Injektion von Mikrogliazellen in die Augen adulter Mäuse zur Bildung prominenter CNV-Membranen führt [84]. Des Weiteren fanden sich im Rahmen einer in-vitro-Studie Hinweise darauf, dass aktivierte Mikrogliazellen Schäden an gesunden Photorezeptorzellen bewirken [114]. Zusammengefasst mehrten sich die Hinweise, dass die Aktivierung von Mikrogliazellen, ihre Migration und Akkumulation zwar einerseits im Rahmen der regulären Immunantwort geschieht, bei chronischer Aktivierung jedoch selbst eine proinflammatorische und proangiogene Umgebung fördert und somit einen wesentlichen Beitrag zum Fortschreiten der Pathogenese der AMD beiträgt [1, 84, 102].

An Zellmigrationsbewegungen und Remodellierungsvorgängen, auch an Umbauvorgängen der extrazellulären Matrix im Rahmen der AMD, sind Matrix-Metalloproteinasen (MMP) beteiligt [113, 144]. Bereits 1998 fanden Steen et al MMP-2 und MMP-9 mRNA in chirurgisch exzidierten CNV-Membranen [134]. 2003 wiesen Lambert et al eine vermehrte Produktion von MMP-2 und MMP-9 in CNV-assoziierten Läsionen in einem laserinduzierten Mausmodell nach und stellten darüber hinaus eine verminderte CNV-Bildung bei Inhibition der MMPs durch Induktion einer endogenen Überexpression der tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) fest [80]. Darüber hinaus ermittelten Chau et al erhöhte Plasmalevel von MMP-9 bei Patienten mit AMD [23].

### **2.3.6 Diagnose**

Aufgrund der verschiedenen Ausprägungsformen ist eine eindeutige Definition der AMD vor allem im Frühstadium schwierig [16, 35]. In der bereits erwähnten Klassifikation von Bird et al. wurde festgelegt, die frühe Form als altersabhängige Makulopathie zu bezeichnen, wohingegen die Spätformen als AMD zu bezeichnen seien [16]. Während das Frühstadium nahezu immer trocken ist, wird bei den Spätstadien weiter zwischen einer trockenen und einer feuchten Form unterschieden [16, 35].

Für die Diagnose einer altersabhängigen Makulopathie oder ihrer Spätformen muss mindestens eines der in Tabelle 1 dargestellten Kriterien erfüllt sein, wobei ausgeschlossen sein muss, dass dies Folge einer anderen Erkrankung ist [16, 35].

Im Gegensatz zu früheren Versuchen die Erkrankung zu definieren, wird die Sehschärfe nun nicht mehr in die Diagnosestellung mit einbezogen [16]. Dennoch kann die Anamnese mit der Beschreibung von Leseschwierigkeiten in schwachem Licht, Problemen bei der Dunkeladaptation und dem Auftreten von Metamorphopsien einen ersten Verdacht auf das Vorliegen einer AMD liefern [30, 61, 65]. Vor allem die frühen Stadien bleiben jedoch häufig über lange Zeit klinisch unauffällig [61, 65]. Die initiale Anamnese wird durch eine klassische funduskopische Untersuchung ergänzt [30, 35, 61, 65].

frühe Form	Spätformen	
Altersabhängige Makulopathie	Trockene AMD	Feuchte AMD
Gelbliche, weiche oft unregelmäßig begrenzte Drusen: Ablagerungen zwischen dem RPE und der Bruch-Membran mit einem Durchmesser von mindestens 63µm	Scharf begrenzte Bereiche mit Hypo- oder Depigmentierung, verstärkt sichtbaren choroidalen Gefäßen und einem Durchmesser von >175 µm	Subretinale Hämorrhagie
Bereiche mit einer Hyper- oder Hypopigmentierung des RPE		Subretinale neovaskuläre Membranen
		Narben, gliöse oder fibrinoide Ablagerungen
		RPE-Abhebungen, assoziiert mit weiteren AMD-Zeichen

**Tabelle 1: Überblick AMD [16, 35, 62]**

Für eine weitergehende Diagnostik, Charakterisierung und verlässliche Verlaufskontrolle stehen diverse etablierte Verfahren zur Verfügung:

Mit Hilfe des Scanning-Laser-Ophthalmoskopes (SLO) ist es möglich, über die Autofluoreszenz des Augenhintergrundes reproduzierbare Bilder zu erstellen [61, 148]. Drusen weisen entsprechend ihrem Lipofuscingehalt unterschiedliche Muster in der Autofluoreszenz auf, geographische Atrophien erscheinen aufgrund fehlender Autofluoreszenz in ihrem Zentrum dunkel, in den Randbereichen erscheinen die hyperpigmentierten Areale hell [61, 148]. Auch CNVs führen zu Veränderungen der Autofluoreszenz, diese können jedoch sehr vielfältig sein, weshalb hier eine Fluoreszein-Angiographie eine genauere Beurteilung der Erkrankung erlaubt [61, 148]. Hierbei

lassen sich in der Frühphase die neu gebildeten Gefäße und Gefäßnetzwerke anhand ihrer Hyperfluoreszenz erkennen [61, 148]. In der Spätphase zeigt sich durch Leckagen eine diffuse Hyperfluoreszenz, wodurch der Bereich der CNV zunehmend undeutlicher wird [61, 148]. In Bereichen geographischer Atrophie zeigt sich typischerweise eine frühe Hyperfluoreszenz ohne Leckage [61, 62].

Für die Darstellung von Pigmentepithelabhebungen, wie sie vor allem bei neovaskulären Veränderungen auftreten, eignet sich die optische Kohärenztomographie (OCT), in welcher sich Abhebungen als kuppelförmige Wölbungen des RPE darstellen [35, 36]. Auch kleinere Ausbuchtungen in Folge von Drusen können dargestellt werden [36, 61].

Als weitere, ergänzende Verfahren stehen die Indocyaningrün-Angiographie und die Mikroperimetrie zur Verfügung [61].

### **2.3.7 Therapie**

Die Therapie der AMD richtet sich nach Form und Stadium der Erkrankung [5, 65]. Für die trockene Form der AMD gibt es bis dato keine kausalen Therapiemöglichkeiten [7, 61]. Als Behandlungsempfehlung für die frühe Form wurde bislang die Einnahme von ungesättigten  $\omega$ -3-Fettsäuren, Antioxidantien (Vitamin C, E und Betacarotin), Zinkoxid und Kupferoxid genannt, wobei nicht in allen hierzu durchgeführten Studien ein eindeutiger Benefit nachgewiesen werden konnte [7, 38].

Zur Therapie der exsudativen AMD stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, von denen die intravitreale VEGF-Antikörper-Injektion der Goldstandard ist [5, 103, 131]. Hierfür stehen unter anderem Pegaptanib (Macugen), Bevacizumab (Avastin), Ranibizumab (Lucentis) und Aflibercept (Eylea) zur Verfügung, wobei Ranibizumab, Aflibercept und Pegaptanib offiziell zur Behandlung der feuchten AMD zugelassen sind [20, 61, 115]. Diese werden wiederholt, mit einem Mindestabstand von vier Wochen, mit dem Ziel der Stabilisierung und eventuell Verbesserung des aktuellen Sehvermögens intravitreal injiziert [20, 61]. Zur Dauer der Therapie und anderen Therapieregimen liegen diverse Studien vor [61].

Ranibizumab ist ein humanisiertes monoklonales VEGF-Antikörper-Fragment, welche alle biologisch aktiven VEGF-Isoformen inhibiert und eine gute Penetration der Netzhaut aufweist [9, 61].

Bevacizumab ist ein humanisierter monoklonaler VEGF-Antikörper, welcher wie Ranibizumab eine gute Penetration der Netzhaut aufweist [57, 61]. Ursprünglich wurde dieser Antikörper für die Anwendung in der Onkologie entwickelt, wo er in Kombination mit weiteren Chemotherapeutika unter anderem bei Kolon-, Mamma- und Nierenzellkarzinomen eingesetzt wird [10, 43, 103]. Für die AMD-Therapie ist er bislang noch nicht zugelassen worden (Off-Label-Use) [9, 103].

Pegaptanib ist ein Aptamer, welches als anti-VEGF-Agens wirkt [129]. Mit der Bindung an VEGF wird dieses blockiert und inaktiviert [129].

Aflibercept oder VEGF-Trap ist ein fusioniertes Protein aus Anteilen der VEGF-Rezeptoren 1 und 2 mit einem humanen Antikörper und bindet an VEGF-A, VEGF-B und Placenta Growth Factor (PlGF) [118]. Auf Grund einer im Vergleich zu Ranibizumab erhöhten Bindungsaffinität an VEGF sind längere Abstände zwischen den einzelnen Injektionen möglich [118].

Im Folgenden werden weitere Therapieoptionen genannt, die allerdings nicht, oder nicht mehr, zu den Standardverfahren bei AMD zählen: Als symptomatische Therapieoptionen zur Reduktion der CNV stehen die thermische Laserkoagulation und die photodynamische Therapie zur Verfügung [35, 61]. Diese konnten gewisse Erfolge in Bezug auf Stabilität und Stillstand der Erkrankung verzeichnen [61], werden aber im Zeitalter der anti-VEGF-Therapie nur noch selten angewendet.

Bei der Laserkoagulation wird die Energie des Laserstrahls durch Absorption im Zielgewebe in thermische Energie umgewandelt [35, 61]. Hierdurch wird im angrenzenden Gewebe eine Koagulation und Narbenbildung induziert [35, 61]. Auf Grund des Aufkommens von anderen Behandlungsmethoden beschränkte sich die Indikation zur Laserkoagulation auf klar abgrenzbare, extrafoveolär gelegene klassische CNV, welche sich lediglich bei etwa 6% der symptomatischen AMD-Patienten findet [35, 103]. Sie ist heutzutage nicht mehr *lege artis* [103].

Auch die photodynamische Therapie (PDT) arbeitet mit der Applikation von physikalischer Lichtenergie [35, 103]. Die hierbei eingebrachte Energie ist jedoch nicht intensiv genug, um zu thermischen Schäden des umgebenden Gewebes zu führen, sondern dient lediglich zu Aktivierung des intravenös applizierten Farbstoffs Verteporfin, wodurch ein lokalisierter Gefäßwandschaden entsteht, der eine Thrombosierung des betroffenen Gefäßes bewirkt [35, 61]. Da bei dieser Methode keine Netzhautstrukturen geschädigt werden, eignet sie sich bei subfoveolärer Lage der CNV, wird heute jedoch

im Rahmen der AMD-Therapie allenfalls in Kombination mit einer Anti-VEGF-Therapie eingesetzt [35, 103].

## **2.4 Grundlagen zur Herleitung des Mausmodells**

### **2.4.1 CX3CR1-Fraktalkin-Rezeptor**

Fraktalkin ist ein Transmembranprotein und Chemokin, welches an der Adhäsion und Migration von Leukozyten beteiligt ist [21]. Der CX3CR1-Rezeptor findet sich unter anderem auf Mikrogliazellen, dendritischen Zellen und Makrophagen, welche eine zentrale Rolle im Immunsystem des Auges spielen, sowie in Monozyten des Blutes [1, 21, 28, 29, 42, 46, 95]. Combadière et al. konnten nachgewiesen werden, dass Mikrogliazellen die einzigen residenten Zellen der Retina sind, welche CX3CR1 exprimieren [29]. Für RPE-Zellen konnten keine CX3CR1-Rezeptoren nachgewiesen werden [29].

### **2.4.2 CX3CR1-knock-in-Mäuse**

Der Austausch von einem Allel des CX3CR1-Gens von Mäusen gegen green fluorescent protein (GFP) resultiert in keiner Veränderung der Funktion von immunologischen Vorgängen in diesen Tieren, führt jedoch zu einer intrinsischen Fluoreszenz der den Fraktalkin-Rezeptor exprimierenden Zellen (CX3CR1<sup>+/gfp</sup>) [28, 37, 68]. Hierdurch kann einerseits in-vivo die Anordnung dieser Zellen mit der Scanning-Laser-Ophthalmoskopie bei Anregung mit 488nm beobachtet werden, andererseits die absolute Zellzahl ex-vivo in der Durchflusszytometrie bestimmt werden und über Färbemethoden für weitere extrazelluläre Marker eine genauere Differenzierung der Zellen vorgenommen werden [15, 37, 68].

### **2.4.3 PPAR $\gamma$ -Rezeptor**

PPAR-Rezeptoren existieren in drei Isoformen [12, 124]. Alle sind Liganden-regulierte Transkriptionsfaktoren, welche Einfluss auf die Genexpressionen nehmen [12, 124]. Fettsäuren und Eicosanoide sind natürliche Liganden dieser Rezeptoren, es existieren jedoch deutlich stärkere synthetische Liganden wie Fibrate und Thiazolidindione [12,

124]. Bei Bindung eines Liganden an das responsive Element des Rezeptors (PPRE) erfolgt ein Anstieg der betreffenden Gentranskription [19, 124].

Für PPAR $\gamma$  wurde bereits eine signifikante antiinflammatorische Wirkung in Colon-Entzündungsmodellen nachgewiesen [12]. Auch konnte eine herabregulierende Wirkung auf die Makrophagenaktivierung, Mikrogliaaktivierung und Astrozytenaktivierung, sowie die Inhibierung der Zytokinproduktion durch Monozyten gezeigt werden [8, 66, 112, 136].

Beim Menschen sind bis jetzt drei Isoformen bekannt, wobei die erste Form die am häufigsten auftretende ist und sich in Adipozyten, der Muskulatur, im Gastrointestinaltrakt sowie in Niere, Pankreas und Milz findet [8, 40, 41, 58]. Darüber hinaus wurde sie auch in der Neuroretina und im retinalen Pigmentepithel, sowie in Immunzellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen und Lymphozyten nachgewiesen [13, 19, 58, 93]. Auch in Mikrogliazellen wurde dieser Rezeptor gefunden [13, 136].

Die zweite Isoform findet sich im Kolon und in Adipozyten [40, 76, 93, 124]. Hier fördert sie die Adipozytendifferenzierung von Fibrozyten hin zu reifen Adipozyten, kontrolliert die Lipidaufnahme in Adipozyten und reguliert Leptin herunter [71, 76, 93, 124]. Des Weiteren wird durch PPAR $\gamma_2$  die TNF $\alpha$ -Expression der Adipozyten sowie die TNF $\alpha$ -induzierte Insulinresistenz inhibiert, was sich in der Nutzung von PPAR $\gamma$ -Agonisten als eine der Komponenten der oralen Diabetestherapie niederschlägt [13, 71].

Die dritte Isoform konnte wie die zweite nur in Adipozyten und im Kolon nachgewiesen werden [41].

2000 konnten Murata et al. zeigen, dass humane choroidale Endothelzellen und Zellen des retinalen Pigmentepithels PPAR $\gamma_1$ -mRNA exprimieren und dass durch intravitreale Injektion von Agonisten eine laserinduzierte CNV inhibiert werden kann [94].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass PPAR $\gamma$ -Rezeptoren bei Aktivierung eine antiinflammatorische Wirkung vermitteln und in Bezug auf für die AMD interessanten Zellen wie Makrophagen, Monozyten, Mikrogliazellen, sowie choroidalen Endothelzellen und retinalen Pigmentepithelzellen zu finden sind [8, 12, 19, 40, 66, 94, 136].

## 2.4.4 Pioglitazon

Glitazone wie Pioglitazon gehören zur Gruppe der Insulinsensitizer [151]. Als solche werden sie in der oralen Diabetes-Typ-II-Therapie als Mono- oder Kombinationspräparate eingesetzt [151].

Als Kontraindikationen für eine Therapie mit Glitazonen gelten Lebererkrankungen, Ketoazidose, Herzinsuffizienz und eine bestehende Schwangerschaft [142, 151].

Unerwünschte Wirkungen, die unter der Therapie auftreten können, sind Gewichtszunahme, Ödeme, Dyspnoe, Osteoporose, Herzinsuffizienz, Anämien und Hypoglykämien [142, 151].

Chemisch gehören sie zu den Thiazolidindionen [130, 151]. Der Wirkmechanismus beruht auf einer intrazellulären Stimulation des PPAR $\gamma$ -Rezeptors [151]. Die für die Diabetestherapie interessanten Wirkungen sind hierbei eine vermehrte Bildung von Glukosetransportern, verringerter Glukoneogenese, erhöhter Glykolyse, verminderter Bildung von TNF $\alpha$  sowie Beeinflussung der Adipozytendifferenzierung [8, 71, 151].

Die nachgewiesene Beteiligung des PPAR $\gamma$ -Rezeptors an der Regulierung von entzündlichen Vorgängen lässt Glitazone jedoch auch für Erkrankungen mit entzündlichen Komponenten in der Pathogenese interessant werden [66, 112, 136, 141]. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass Pioglitazon bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II das Level zirkulierender Entzündungsmarker wie CRP und MCP-1 reduziert [25]. Auch konnte gezeigt werden, dass Pioglitazon in Astrozyten, welche mit Lipopolysacchariden stimuliert wurden, eine Verringerung der Level von unter anderem TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6, sowie eine Erhöhung des Levels von IL-10 bewirkt [108]. In Studien konnte bei der Anwendung am Menschen eine orale Bioverfügbarkeit von 83% festgestellt werden, 96% bei Ratten und 90% bei Affen [4, 85]. Pioglitazon wird durch Hydroxylierung und Oxidation metabolisiert, wobei aktive Metaboliten entstehen, welche langsamer als Pioglitazon selbst eliminiert werden [33]. Dies führt im Menschen bei einer ungefähren Halbwertszeit von 3-7 Stunden für Pioglitazon selbst zu einer gesamten Halbwertszeit aller aktiven Stoffe von etwa 16-24 Stunden [33, 109]. Pioglitazon wird standardmäßig täglich einmalig oral eingenommen, was nach etwa sieben Tagen zu einer stabilen Serumkonzentration von Pioglitazon und seiner aktiven Metaboliten führt [109]. Pioglitazon wurde bereits in diversen Mausmodellen angewendet, wobei sich in der Mehrzahl der Fälle die täglich einmalig verabreichte Dosis in einem Bereich von 13mg/kg KG bis 40mg/kg KG bewegte [22, 111, 145]. Während es in Bezug auf akute

und chronische Toxizität bei Überdosierung in der Maus diverse Studien gibt, ist die Literatur in Bezug auf die orale Bioverfügbarkeit und Plasmahalbwertszeit in der Maus wenig ergiebig [27, 34]. In der Ratte konnte jedoch eine orale Bioverfügbarkeit von 96%, ein maximaler Plasmaspiegel nach 4 Stunden und eine Plasmahalbwertszeit des reinen Pioglitazon von 2,6 Stunden nachgewiesen werden [85].

## **2.4.5 Zytokine und Wachstumsfaktoren**

Die, im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten RT-PCR, beobachteten Gene sind CX3CR1, Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 10 (IL-10), Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ), Interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2) und Matrixmetalloproteinase 9 (MMP-9).

Die folgenden Absätze mit Zusammenfassungen der Gene beziehen sich auf die „Reference Sequence Database“ des „NCBI Handbook“ [144]:

### **CX3CR1**

CX3CR1 ist ein Protein-codierendes Gen. Dessen Produkt, der CX3CR1-Fraktalkin-Rezeptor, ist über seinen Liganden Fraktalkin, einem Transmembranprotein und Chemokin, unter anderem an der Aktivierung von Mikrogliazellen bei Immunreaktionen beteiligt. Außerdem spielt er so eine wichtige Rolle bei der Migration und Adhäsion von Leukozyten und ist sowohl in hemmender als auch in fördernder Wirkung in Angiogenesevorgängen involviert. Das CX3CR1-Gen findet sich beim Menschen auf Chromosom 3 (3p21.3), bei der Maus auf Chromosom 9 [144].

### **IL-6**

Das durch das IL-6-Gen codierte Zytokin ist vornehmlich an Entzündungsvorgängen und der Reifung von B-Zellen beteiligt. Es wird an Orten akuter und chronischer Entzündungsvorgänge gebildet und übt vor allem eine proinflammatorische Funktion aus. Beim Menschen findet sich das Gen auf Chromosom 7 (7p21), bei der Maus auf Chromosom 5 [144].

### **IL-10**

Das von diesem Gen codierte Protein ist ein hauptsächlich von Monozyten, in geringerem Umfang auch Leukozyten produziertes Zytokin. Es hat vielfältige Effekte auf die Regulation von Entzündungsvorgängen. So werden unter anderem B-Zell-Proliferation und Antikörperproduktion gefördert, T-Zell-Proliferation, apoptotische

Prozesse und Zytokinproduktion werden herabreguliert, wodurch es insgesamt eher antiinflammatorische Wirkungen aufweist. Das Gen ist sowohl beim Menschen als auch bei der Maus auf Chromosom 1 lokalisiert (1q31-q32) [144].

### **IL-1 $\beta$**

Auch IL-1 $\beta$  ist ein Protein-codierendes Gen. Das Protein ist ein Mitglied der Interleukin-1-Zytokin-Familie und wird als Proprotein von aktivierten Makrophagen produziert und durch Caspase-1 proteolytisch in seine aktive Form umgewandelt. Es ist ein wichtiger Mediator bei Entzündungsvorgängen und als solcher an Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptosevorgängen, sowie an Monozyten-Aggregationsvorgängen beteiligt. Das IL-1 $\beta$ -Gen bildet mit acht anderen Interleukinen ein Gen-Cluster auf Chromosom 2 (2q14). Auch bei der Maus findet sich dieses Gen auf Chromosom 2 [144].

### **TNF $\alpha$**

Das vom TNF $\alpha$ -Gen kodierte Protein ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches vor allem von Makrophagen sezerniert wird. Es ist an einem breiten Spektrum biologischer Vorgänge beteiligt, unter anderem an Zellaktivierung, -proliferation und differenzierung, sowie an Apoptosevorgängen und dem Lipidstoffwechsel. Außerdem legen erste Studien mit Knock-out-Mäusen eine neuroprotektive Wirkung dieses Zytokins nahe. Bei Menschen findet sich das Gen auf Chromosom 6 (6p21.3), bei der Maus auf Chromosom 17 [144].

### **VEGF**

Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) wirkt als Wachstumsfaktor spezifisch auf Endothelzellen und hat auf diese diverse Effekte. Er vermittelt eine erhöhte vaskuläre Permeabilität, induziert Angiogenese und Endothelzellproliferation, inhibiert Apoptosevorgänge und fördert Zellmigrationen. Als Stimulator für die Angiogenese spielt er eine zentrale Rolle in der feuchten Form der AMD. Beim Menschen befindet sich der Genort auf Chromosom 6 (6p12), bei der Maus auf Chromosom 17 [144].

### **MMP-2 und MMP-9**

Diese Gene sind Mitglieder der Matrix-Metalloproteinase-Familie, deren Produkte in der Lage sind, Komponenten der extrazellulären Matrix zu spalten und so Gewebe-Remodellierungsvorgänge und Zellmigrationsbewegungen ermöglichen [144]. Als solche sind sie auch an den Umbauvorgängen der extrazellulären Matrix im Rahmen der AMD beteiligt [113].

MMP-2 weist neben seiner Rolle bei Organisationsvorgängen der extrazellulären Matrix und Proteolysevorgängen eine Beteiligung an Angiogenesevorgängen und der Reifung von Blutgefäßen auf [144]. MMP-9 zeigt unter anderem eine Beteiligung an Leukozytenmigration und Makrophagendifferenzierung [144]. MMP-2 findet sich beim Menschen auf Chromosom 16 (16q13-q21), bei der Maus auf Chromosom 8, MMP-9 findet sich beim Menschen auf Chromosom 20 (20q11.2-q13.1), bei der Maus auf Chromosom 2 [144].

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Vorgehen**

Zur Untersuchung der eingangs aufgeworfenen Fragestellung kombinieren wir verschiedene Methoden. In einem in-vitro-Vorversuch wird zunächst ein Einfluss von Pioglitazon auf die Apoptose und Zellteilungsrate von in Zellkultur kultivierten humanen retinalen Endothelzellen (hREZ) untersucht. Als Endothelzellen retinaler Gefäße findet hier der erste Kontakt von systemisch applizierten therapeutischen Substanzen mit der Retina statt [64]. Für die Versuche werden CFSE-gefärbte hREZ auf 24-Well-Platten ausgesät und zunächst für 24 Stunden inkubiert, anschließend werden den Wells unterschiedliche Konzentrationen von in DMSO gelöstem Pioglitazon hinzugefügt. Wells mit ausschließlicher Zugabe von DMSO dienen als Kontrolle. Anschließend werden die Zellen nach unterschiedlichen Zeitpunkten aus den Wells herausgelöst und im Rahmen von durchflusszytometrischen Messungen auf absolute Zellzahl lebender und apoptotischer Zellen, sowie CFSE-Intensität der Zellpopulation untersucht.

Im Rahmen von in-vivo- und ex-vivo-Versuchen werden anschließend das Migrationsverhalten, die Verteilung verschiedener Immunzellpopulationen in Retina und Choroidea sowie die Genexpression von an Entzündungsvorgängen beteiligten Zytokinen gemessen.

Die im Rahmen dieser Versuche verwendeten Chemikalien, Medikamente, Kits sowie die zur Auswertung verwendete Software sind im Anhang in Tabelle 7, Tabelle 8 und Tabelle 9 dargestellt.

### **3.2 Vorbereitung der durchflusszytometrischen**

#### **Untersuchungen**

Im Rahmen der durchflusszytometrischen Untersuchungen wird eine Verdaulösung zum Herauslösen der Zellen aus den Wells der Platten benötigt, darüber hinaus wird eine Pufferlösung zum Waschen und als Suspensionslösung für die gewonnenen Zellen benötigt. Beide Lösungen werden jeweils zum Beginn einer Versuchsreihe angesetzt und bei 4° gelagert.

Für die Verdaulösung der FACS-Versuche werden 5mL  $\beta$ -Mecaptoethanol (5mM), 5mL Pen/Strep (1%ig), 5mL L-Glutamin (200mM), 10mL HEPES (20mM) und 10mL FCS mit

465mL RPMI 1640 auf 500mL aufgefüllt. Direkt vor der Verwendung werden je 100µL Kollagenase und DNase (jeweils 100mg/mL in PBS gelöst) hinzugefügt.

Für den FACS-Puffer wird mit 500mL PBS durch Zugabe von NaAzid und FCS eine jeweils 0,1%ige Lösung erstellt.

### **3.3 Vorversuch durchflusszytometrische Messung in-vitro**

Zur Untersuchung der Auswirkung von Pioglitazon auf Apoptose und Zellteilungsrate von in Zellkultur kultivierten humanen retinalen Endothelzellen (hREZ) werden zunächst CFSE-gefärbte humane retinale Zellen auf 24-Well-Platten ausgesät (vgl. Abbildung 2). Die Zellfärbung mit Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) erlaubt es, Zellproliferation im zeitlichen Verlauf zu bestimmen, da sich die Intensität der Färbung nach jeder Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt [83].

Den ausgesäten Zellen wird Medium und verschiedene Konzentrationen von in DMSO gelöstem Pioglitazon hinzugefügt. Hierzu wird eine Lösung von 1% Pioglitazon in DMSO (Pio-DMSO) verwendet. Die so hergestellten Proben werden als Pio5 (0,5µL Pio-DMSO auf 1000µL Zellsuspension), Pio10 (1µL Pio-DMSO auf 1000µL Zellsuspension), Pio20 (2µL Pio-DMSO auf 1000µL Zellsuspension), Pio40 (4µL Pio-DMSO auf 1000µL Zellsuspension) und Pio80 (8µL Pio-DMSO auf 1000µL Zellsuspension) bezeichnet. Zusätzlich werden zwei Kontrollgruppen verwendet. Der einen Gruppe wird die höchste bei Zugabe von Pio-DMSO verwendete DMSO-Konzentration hinzugefügt (8µL DMSO auf 1000µL Zellsuspension; Bezeichnung: DMSO80), der anderen Gruppe werden keinerlei weitere Substanzen hinzugefügt (Bezeichnung: Kontrolle)

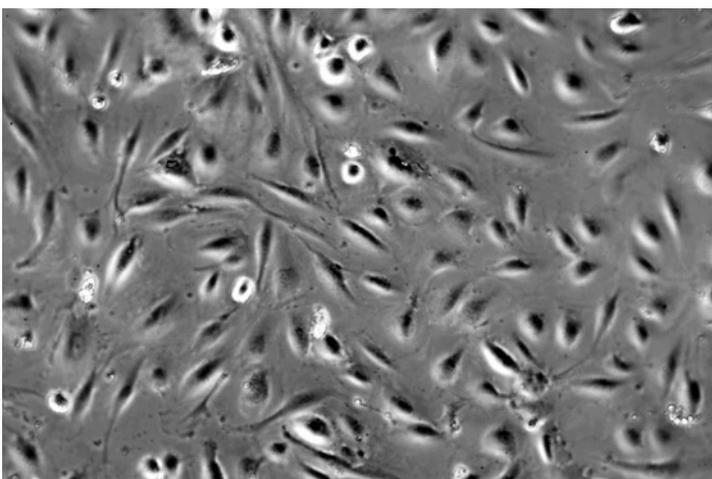
Die Platten werden für 24h, 48h oder 72h bei 36°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, anschließend die Zellen mit der Verdauung aus den Wells herausgelöst und in FACS-Puffer überführt, Höchst-gefärbt und mit einer definierten Menge an Beads vermischt. Die Höchst-Färbung basiert auf einer Bindung des Farbstoffes an intrazelluläre DNA [81]. Der Einstrom des Farbstoffes in die Zelle ist zeitabhängig und geht bei apoptotischen Zellen auf Grund einer erhöhten Permeabilität der Zellmembran schneller von statten [44]. Somit erlaubt die Höchst-Färbung bei zeitlich begrenztem Kontakt des Farbstoffes mit den zu färbenden Zellen eine Differenzierung zwischen lebenden und apoptotischen Zellen [44].

Nun werden mit dem BD FACSCanto II Flow Cytometer<sup>2</sup> die Zellzahlen der Höchstgefärbten Zellen und die Intensität der CFSE-Färbung durchflusszytometrisch gemessen. Aus der Relation der gemessenen Beads und der gemessenen Zellsignale lässt sich über die bekannte Gesamtzahl Beads in der Probe die Anzahl Zellen in der Ausgangsprobe berechnen. Die Intensität der CFSE-Färbung (Mean Fluorescent Intensity, MFI) einer einzelnen Zelle nimmt mit jeder Zellteilung ab, weshalb diese Intensität einen Rückschluss auf die erfolgten Zellteilungen zulässt. Zusätzlich lässt sich in Experimentreihen, in denen zu mehreren Zeitpunkten gemessen wurde, die durchschnittliche Anzahl an Teilungszyklen der Zellen berechnen. Dies erfolgt, unter Annahme eines exponentiell verlaufenden Zellteilungsmusters, über die Berechnung des dekadischen Logarithmus des Quotienten aus der MFI des früheren Zeitpunktes zur MFI des späteren Zeitpunktes:

$$\text{Anzahl vollständiger Teilungszyklen} = \text{LOG} \frac{\text{MFI früherer Zeitpunkt}}{\text{MFI späterer Zeitpunkt}}$$

Somit stehen für die Analyse die absoluten Zellzahlen, die MFI, sowie die aus der MFI berechneten Teilungszyklen zur Verfügung.

Pro Experimentreihe werden 3 Proben je Konzentration und Zeitpunkt gemessen und die Experimente insgesamt fünf Mal durchgeführt.



**Abbildung 2: humane retinale Endothelzellen in Zellkultur**

---

<sup>2</sup> BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

### 3.4 Mausmodell

Wie eingangs erwähnt wird im Rahmen der in-vivo und ex-vivo-Versuche das Migrationsverhalten, die Verteilung verschiedener Immunzellpopulationen in Retina und Choroidea sowie die Genexpression von an Entzündungsvorgängen beteiligten Zytokinen gemessen. Hierzu werden die einzelnen Tiere zunächst unterschiedlichen Versuchsgruppen zugeordnet. Es erfolgt eine Zuordnung zu einer von drei möglichen Gruppen. Die Tiere in der ersten Versuchsgruppe erfahren keinerlei Behandlung bevor sie den Messungen zugeführt werden. In den anderen beiden Gruppen wird mittels Laserapplikation eine CNV induziert. Die laserinduzierte CNV-Induktion bei der Maus ist ein etabliertes Verfahren, die Parameter des verwendeten Lasers wurden anhand von Probelaserherden zu Beginn der Experimente kalibriert und für alle anschließend durchgeführten Experimente beibehalten [79]. Die der Laserbehandlung zugeführten Gruppen unterscheiden sich in der Art der vor, und für eine definierte Zeit nach der CNV-Induktion applizierten Substanz. So erhält eine Kontrollgruppe eine Methylcellulose-Lösung, während der Lösung der Experimentgruppe zusätzlich Pioglitazon zugesetzt wird. Nach einer Woche täglicher Gavage der jeweiligen Substanz folgt die Laserapplikation. Anschließend erfolgt über unterschiedliche, definierte Zeiträume eine Fortführung der täglichen Gavage und nach Abschluss dieser die Zuführung der Mäuse zu den jeweiligen Messungen. In die Berechnungen der In-Vivo-Autofluoreszenzuntersuchungen fließen die Daten von insgesamt 29 Mäusen ein, in die der Ex-Vivo-RT-PCR die von insgesamt 81 Mäusen und in die der Ex-Vivo-Durchflusszytometrie Daten von insgesamt 70 Mäusen. Die Anzahl der Tiere in den Kontroll- und Experiment-Gruppen findet sich in der jeweiligen Beschreibung der Methode. Die Tierversuche wurden am 01.02.2012 unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2011.A086 vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt.

Ein Überblick zur Einteilung der Mäuse und Aufbau der Experimente liefert Abbildung 3.

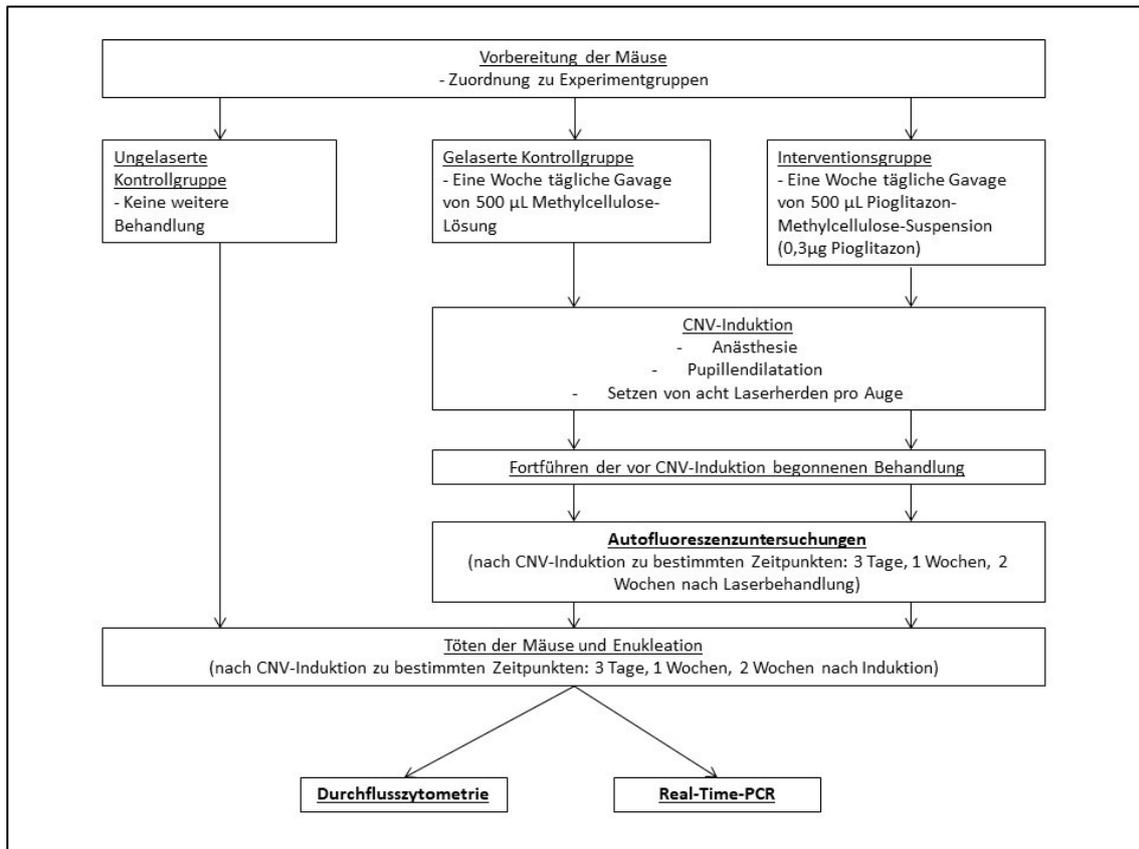


Abbildung 3: Überblick Experimentaufbau Mausmodell

### 3.4.1 Ansatz Pioglitazon-Methylcellulose-Suspension

Mit autoklaviertem Wasser und Methylcellulosepulver (Carboxymethylcellulose sodium salt, Sigma, C5678-500G) wird zunächst eine 0,5%ige Methylcelluloselösung hergestellt. Diese wird zur Fütterung der Kontrollgruppe verwendet. Für die Experimentgruppe wird eine Suspension mit einer Pioglitazondosis von 0,6mg/mL hergestellt. Hierzu werden der hergestellten Methylcelluloselösung in einem Mörser zerstoßene Tabletten Pioglitazon (Actos® 30mg) zugesetzt und gut verrührt. Da sich diese nicht vollständig in Lösung bringen lassen, ist vor jeder Fütterung ein erneutes verrühren nötig. Die Suspension wird zu Beginn jeder Versuchsreihe einmalig angesetzt und für die Dauer bei 4°C gelagert.

### 3.4.2 Vorbereitung der Mäuse

Für die Autofluoreszenz- und FACS-Versuche werden CX3CR1-knock-in-Mäuse verwendet (bezogen von Prof. Dr. Christian Kurts, Institut für Experimentelle

Immunologie, Bonn, Deutschland). Für RT-PCR-Versuche werden Black-6-Mäuse (Charles River; Deutschland) verwendet. Das Alter der Tiere zu Beginn der Analysen beträgt zwischen 8 und 16 Wochen. Zur Analyse des durch Pioglitazon erzielten Effektes werden die Mäuse zunächst eine Woche lang per oraler Gavage mit 500 µL Pioglitazon-Methylcellulose-Suspension oder in der Kontrollgruppe nur mit einer Methylcellulose-Lösung<sup>3</sup> gefüttert. Bei einem durchschnittlichen Körpergewicht von 20-30g ergibt sich somit eine Pioglitazon-Tagesdosis von 10-20mg/kg KG [143]. Am siebten Tag werden die Augenhintergründe der Mäuse gelasert (Laser 532nm; Haag Streit, Bern, Schweiz), wobei in jedem Auge acht Laserherde (50µm Durchmesser, Energie von 200mW, appliziert über 100msek) gesetzt werden. Hierzu werden die Mäuse intraperitoneal mit Ketamin/Xylazin 10% anästhesiert, zusätzlich erfolgt eine Lokalanästhesie der Augen mit Proparacain 1%. Die Pupillen werden mit Neosynephrin-POS 5% and Cyclopentolat Alcon 1% Augentropfen dilatiert. Die Mäuse werden daraufhin für drei, sieben und 14 weitere Tage mit der entsprechenden Suspension gefüttert, dann mittels Isofluran-Narkose und Genickbruch getötet und die Augen entnommen.

### 3.4.3 In-vivo Autofluoreszenz

Autofluoreszenzuntersuchungen des Augenhintergrundes werden bei lebenden Mäusen drei Tage, sechs Tage und 13 Tage nach Laser durchgeführt. Hierbei werden CX3CR1-<sup>+GFP</sup>-Mäuse verwendet, bei welchen ein Allel des CX3CR1-Gens durch GFP ersetzt wurde und so CX3CR1-GFP-exprimierende Zellen des Augenhintergrundes mit dem konfokalen Scanning Laser Ophthalmoskop Spectralis® HRA und OCT (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Deutschland) sichtbar gemacht werden können [101]. Die Helligkeit der Pixel des so entstandenen Bildes korreliert direkt mit der Dichte der im jeweiligen Bildabschnitt vorhandenen Zellen. Die Tiere werden mit Pioglitazon respektive Cellulose gefüttert, sowie zu verschiedenen Zeitpunkten nach Laserbehandlung untersucht. Die so erhaltenen Bilder werden auf die Intensität des GFP hin untersucht.

Über die Intensitätsmessung des GFP-Signals in definierten Arealen der Laserherde und ihrer Umgebung kann daraufhin eine Aussage über die Dichte der GFP-positiven Zellen und somit indirekt über das Migrationsverhalten dieser Zellen getroffen werden. Da die residenten Immunzellen der Retina (Mikrogliazellen) in die Laserherde einwandern, nimmt innerhalb der Herde die Intensität zu, in der direkten Peripherie nimmt sie

---

<sup>3</sup> Im Folgenden wird für den Begriff „Methylcellulose“ abkürzend „Cellulose“ verwendet

hingegen ab. Laserherde, welche Überlappungen mit anderen Herden aufweisen oder im Rahmen der Bildgebung nicht vollständig erfasst werden können, werden nicht für die Berechnungen herangezogen.

Zur Messung wird die Software „imagej“ (National Institutes of Health, USA) verwendet. Zur objektiven Berechnung wird eine, in der Zwischenzeit veröffentlichte, Methode entwickelt [3]: Für die Intensitätsmessung der Laserherde wird eine Kreisfläche ausgewählt, welche die Ränder der Laserherde an keinem Punkt überlappt, um falschniedrige Messungen der Intensität zu verhindern. Die so gewählte Fläche eines Kreises mit dem Durchmesser von 116 Pixeln wird für eine verbesserte Objektivität über alle Experimentreihen beibehalten. Der so gemessene Wert bezeichnet die Laserherdintensität.

Für die Peripherie eines Laserherdes wird eine Fläche definiert, welche sich, ausgehend vom Rand eines Laserherdes, um weitere 116 Pixel in die Peripherie erstreckt. Aufgrund der Einschränkungen der optischen Bildgebung, welche es bei peripher gelegenen Laserherden nicht durchgängig erlaubt, diesen, den Laserherd umgebenden Peripheriering vollständig zu messen, werden repräsentativ drei maximal voneinander entfernte Kreisflächen mit einem Pixeldurchmesser von 116 gemessen. Das aus diesen drei Werten errechnete arithmetische Mittel wird als Peripherieintensität bezeichnet (vgl. Abbildung 4).

Aus dem Wert der Laserherdintensität und dem der Peripherieintensität wird der neu eingeführte Intensitätsquotient berechnet. Dieser errechnet sich aus dem Quotienten von Laserherdintensität und Peripherieintensität:

$$\text{Intensitätsquotient} = \frac{MFI(\text{Laserherd})}{MFI(\text{Peripherie})}$$

Je kleiner dieser Quotient ist [bei Annahme, dass  $MFI(\text{Laserherd}) > MFI(\text{Peripherie})$ ], desto geringer ist der Unterschied der Zelldichte von Laserherd und seiner Peripherie und desto weniger Auswirkung zeigt die Laserbehandlung auf die Migration der Zellen.

Die Berechnung der Autofluoreszenzuntersuchungen erfolgt an den Augen von insgesamt 29 Tieren. In deren 58 Augen finden sich 250 Laserherde, welche die Einschlusskriterien erfüllen können. Da die vorgestellte Methode zwingend das

Vorhandensein von Laserherden erfordert, wird in diesem Experimentaufbau keine ungelaserte Kontrolle miteingeschlossen.

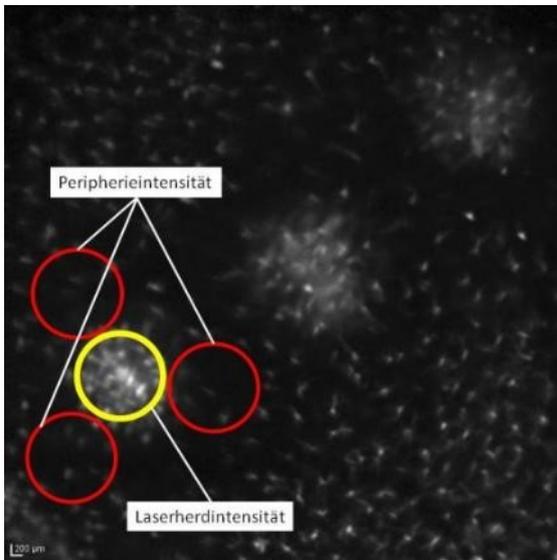


Abbildung 4: Darstellung der Messung von Laserherdintensität und Peripherieintensität, Durchmesser der Messareale 116 Pixel

### 3.4.4 Ex-vivo-Messungen: RT-PCR und Durchflusszytometrie

Zur Durchführung der durchflusszytometrischen Untersuchungen und der RT-PCR ist ein Töten der Mäuse mit anschließender Entnahme der Augen notwendig. Für beide Versuchsreihen werden die getrennten Gewebeschichten von Choroidea und Retina benötigt, welche anschließend weiterbehandelt werden. Im Rahmen der RT-PCR wird zusätzlich eine Experimentreihe an ungetrennten Geweben des Augenhintergrundes durchgeführt.

Für die Durchflusszytometrie ist eine Suspension von einzelnen Zellen erforderlich, während für die RT-PCR die cDNA der Gewebe benötigt wird.

Im Rahmen beider Versuchsreihen werden zunächst Kontrollen des Modells durchgeführt. Hierzu werden ungelaserte Tiere, welche keiner weiteren Behandlung zugeführt werden, mit gelaserten und Cellulose-gefütterten Tieren verglichen.

Die Gewinnung der Präparate zur Messung der Daten im Rahmen dieser Experimente wird im Folgenden beschrieben.

### 3.4.4.1 Gewinnung der murinen Retina und Choroidea

Die enukleierten Augen der Mäuse werden seitlich am Limbus mit Hilfe einer Kanüle aufgestochen. Daraufhin werden sie entlang des Limbus aufgeschnitten und die Cornea abgenommen. Das Auge wird nun auf die Linse gedreht, wodurch der Sehnervenaustrittspunkt nach oben zeigt. Mit einer Schere wird nun die Choroidea eingeschnitten, mit einer Pinzette abgezogen, der Sehnerv durchtrennt und das Gewebe in ein Epi gegeben. Darauf wird mit einer Pinzette auch die Retina vom Rest des Auges abgehoben und in ein separates Epi gegeben.

Die Netzhäute beider Augen einer Maus werden gepoolt, genauso wird auch mit den Aderhäuten verfahren. Hierdurch ergeben sich pro Maus zwei Proben.

Gewebe, welche für die Durchflusszytometrie verwendet werden sollen, kommen in ein Epi, welches mit 0,5µL RPMI gefüllt ist. Gewebe, aus welchen RNA gewonnen werden soll, kommen ohne weitere Substanzen in ein Epi und werden bei -80°C eingefroren.

Für die im Rahmen der RT-PCR durchgeführten Untersuchungen ohne Trennung von Retina und Choroidea wird nach Aufschneiden des Limbus und Abnahme der Cornea der gesamte Augenhintergrund abgehoben und ohne weitere Alteration eingefroren.

### 3.4.4.2 Ex-vivo RT-PCR

Zur Messung der Genexpression an cDNA ist es zunächst erforderlich, die murine retinale und choroidale RNA zu isolieren. Hierzu wird das RNeasy Microkit und Qia-Shredder von Qiagen verwendet.

Zur gefrorenen Probe werden 350µL Lyse-Puffer (1mL RLT-Puffer + 10µL β-Mercaptoethanol) gegeben. Die Gewebestruktur und Zellintegrität der Probe wird nun mit einem Gewebeshredder<sup>4</sup> zerstört, die erhaltene Flüssigkeit auf einen Qia-Shredder überführt und zentrifugiert (2min, 15.000rpm). Das Zentrifugat wird mit 350µL 70% Ethanol (7mL AppliChem, ethanol absolute + 3mL nuclease-free Water, Qiagen) auf eine SpinColumn<sup>5</sup> überführt und erneut zentrifugiert (15sec, 12.000rpm). Das neu entstandene Zentrifugat wird verworfen, auf die SpinColumn werden 350µL RW1-Puffer<sup>5</sup> gegeben und wieder abzentrifugiert (15sec, 12.000rpm). Auf den Boden der SpinColumn werden 80µL DNase-Lösung<sup>5</sup> gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur einwirken

---

<sup>4</sup> Polytron PT 1200 e; Kinematica AG, Luzern, Schweiz

<sup>5</sup> Aus dem Mikrokit

gelassen. Dann werden nacheinander, mit zwischenzeitlichem Abzentrifugieren (15sec, 12.000rpm, letzte Zentrifugation 2min), 350µL RW1-Puffer und zwei Mal 500µL RPE-Puffer<sup>5</sup> auf die Säule gegeben. Dann werden die Säulen für fünf Minuten mit offenem Deckel bei 15.000rpm zentrifugiert, auf ein 1,5mL Collection Tube<sup>5</sup> gesetzt und 16µL RNase freies Wasser<sup>5</sup> auf den Boden der Column gegeben. Nach erneuter Zentrifugation (1min, 15.000rpm) wird die nun isolierte RNA bei -70°C eingefroren.

Aus diesen Geweben ist es möglich, cDNA zu synthetisieren. Hierfür wird zunächst die RNA-Konzentration der einzelnen Proben am Nano-Drop<sup>6</sup> gemessen. Von jeder Probe wird nun das Volumen entnommen, welches 200ng RNA enthält und mit RNase-freiem Wasser vermischt um ein Endvolumen von 13,2µL Probe in einem 0,2mL Tube<sup>7</sup> zu erhalten. Zu jeder Probe werden nun 6,8µL eines Mix aus RT-Puffer, dntp-Mix, Random-Primer, Reverse-Transcriptase und RNase-Inhibitor gegeben<sup>8</sup>.

Für die cDNA-Synthese werden die Proben in einen Tetrad 2 Thermocycler<sup>9</sup> gestellt, welcher entsprechend des in Tabelle 2 dargestellten Programmes eingestellt wird.

Zyklus	Temperatur	Dauer
1	25°C	10 Minuten
2	37°C	2 Stunden
3	85°C	5 Minuten
4	8°C	Bis Entnahme

**Tabelle 2: Einstellung des Thermocycler für die cDNA-Synthese**

Nach Ablauf des Programms wird die gewonnene cDNA bei -20°C eingefroren.

Anhand der synthetisierten cDNA kann nun die Genexpression einzelner Zytokine und Wachstumsfaktoren der Pioglitazon-gefütterten Tiere mit denen der Kontrollgruppe

<sup>6</sup> Nano Drop 2000c Spectrophotometer; Thermo Scientific, Waltham, USA

<sup>7</sup> LifeScience Products, Brand

<sup>8</sup> HighCapacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems

<sup>9</sup> Peltier Thermal Cycler, BioRad

verglichen werden. Die beobachteten Gene sind CX3CR1, IL-6, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , VEGF, MMP-2 und MMP-9. Als Housekeeping-Gene dient GAPDH. Alle Primer stammen aus dem QuantiTect Primer Assay von Qiagen.

Die cDNA-Probe wird durch Zugabe von 60 $\mu$ L RNase-freien Wassers auf 200ng/80 $\mu$ L verdünnt. Dann werden 4 $\mu$ L der Probe mit 1 $\mu$ L Primer und 5 $\mu$ L SyberGreen<sup>10</sup> in ein Well einer 384-Well-Platte<sup>11</sup> pipettiert. Von jeder Probe werden Doppelansätze bereitgestellt, sodass von jeder Probe die verschiedenen Primer zweifach gemessen werden. Sobald alle Proben aufgetragen sind wird die Platte mit einer Folie<sup>12</sup> überklebt, für eine Minute bei 1200rpm abzentrifugiert<sup>13</sup> und im Taq-Man<sup>14</sup> gemessen. Die erhaltenen C<sub>t</sub>-Werte sagen aus, wie viele Vervielfältigungszyklen nötig waren, um einen Genabschnitt in einer vom Gerät messbaren Konzentration zu erhalten. Über die 2<sup>- $\Delta$ C<sub>t</sub></sup>-Methode ist es möglich, die relative Expressionsänderung von Pioglitazon-behandelten Tieren im Vergleich zu unbehandelten Tieren zu berechnen [121]. Unter der Annahme, dass sich der C<sub>t</sub>-Wert des Housekeeping-Genes in Folge der unterschiedlichen Behandlung der Mäuse nicht ändert, wird dieser Wert als Basiswert gesetzt und die Differenz der C<sub>t</sub>-Werte der zu beobachtenden Gene und des Basiswertes für die weitere Berechnung herangezogen [121]. Dieser  $\Delta$ -C<sub>t</sub>-Wert erlaubt die Bestimmung des „fold change“, über welchen die Berechnung der Signifikanz erfolgt [121]: Fold change = 2<sup>- $\Delta$ C<sub>t</sub></sup>

Die Expression wird zunächst in geringer Probenzahl an ungetrennten Präparaten des Augenhintergrundes, welche Retina und Choroidea beinhalten, gemessen, anschließend auch in separaten Präparaten von Retina und Choroidea. Die Untersuchungen werden mit Präparaten durchgeführt, welche zu zwei verschiedenen Zeitpunkten nach der Laserbehandlung gewonnen werden. Dies sind drei Tage, sowie zwei Wochen nach Behandlung.

Die Beschriebenen Untersuchungen werden an insgesamt 81 Mäusen durchgeführt. Hiervon werden sieben Tiere als ungelaserte und unbehandelte Kontrollgruppe bestimmt, Messungen an ungetrennten Gewebepaketen von Retina und Choroidea werden an insgesamt 18 Tieren durchgeführt. Für den eigentlichen Experimentaufbau

---

<sup>10</sup> Power SYBR Green, PCR Master Mix, Qiagen

<sup>11</sup> 4309849, AppliedBiosystems

<sup>12</sup> Absolute QPCR Seal, AB-1170, Thermo Scientific

<sup>13</sup> 4K15C, Sigma

<sup>14</sup> TaqMan: 7900HT Fast Real-Time PCR System mit 384-Well Block Modul; Life Technologies by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

mit Bestimmung der Genexpression an getrennten retinalen und choroidalen Geweben werden 56 Mäuse verwendet.

### 3.4.4.3 Ex-vivo Durchflusszytometrie

Die im Rahmen der Separierung von Retina und Choroidea gewonnenen, gepoolten Gewebe eines Tieres werden nach auf eine 12-Well-Platte gegeben. Zur Vereinzelnung der Zellen werden die Gewebe zunächst mit einer Schere mechanisch zerkleinert, dann mit einer DNase und Kollagenase enthaltenden Verdauungslösung für 20 Minuten (Retina) und 40 Minuten (Choroidea) bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Mit Hilfe einer Pipette wird regelmäßig für eine ordentliche Durchmischung der Zellsuspension gesorgt. Diese Suspension wird schließlich durch filtern über Gaze<sup>15</sup> und anschließendes nachspülen mit kaltem Medium auf eine neue 12-Well-Platte überführt. Von hier werden die Suspensionen in FACS-Tubes überführt, für fünf Minuten bei 250G zentrifugiert und die Überstände dekantiert. Die Zellen werden zum Waschen nun mit 2mL FACS-Puffer erneut in Suspension gebracht, zentrifugiert und dekantiert. In die verbleibenden ca. 80µL werden nun 19µL FACS-Puffer zusammen mit 1µL Fc-Block<sup>16</sup> pipettiert und bei 4°C inkubiert. Nach fünf Minuten werden 0,5µL CD11b-Antikörper<sup>17</sup> zusammen mit 19,5µL FACS-Puffer hinzugegeben und für weitere 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Hierauf erfolgt eine weitere Zentrifugation und ein Waschgang mit 2mL FACS-Puffer. Daraufhin werden die Proben in 200µL FACS-Puffer resuspendiert.

Direkt vor der durchflusszytometrischen Messung werden den Proben jeweils 10µL einer APC-Beads-Suspension<sup>18</sup> der Konzentration 10<sup>6</sup>/mL hinzugefügt.

Für die durchflusszytometrische Messung wird ein BD FACSCanto II Flow Cytometer<sup>19</sup> verwendet. Zur Auswertung werden die Kanäle SSC-A, FSC-A, FSC-W, GFP-A und APC-A betrachtet. Die Spannungen der Kanäle GFP-A und APC-A werden so eingestellt, dass negative Signale bei etwa 2\*10<sup>2</sup> und hoch positive Signale bei über 2\*10<sup>3</sup> angezeigt werden. Werte dazwischen werden als „intermediate“ angesehen.

Das Vorgehen zur Zelldifferenzierung ist exemplarisch in Abbildung 5 dargestellt. Aus der Darstellung FSC-A gegen APC-A lässt sich die Gruppe der Beads bestimmen. Da

---

<sup>15</sup> Cell Strainer, 70µm Nylon, REF 352350, BD Falcon

<sup>16</sup> Mouse BD Fc-Block, BD Biosciences

<sup>17</sup> Anti-mouse CD11b, APC conjugated, 17-0112-82, eBioscience

<sup>18</sup> APC-Beads, BD

<sup>19</sup> BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

FSC-A in etwa die Länge der signalgebenden Strukturen widerspiegelt und davon auszugehen ist, dass die Zellen in ihrer Morphologie größer als die Beads sind, kann davon ausgegangen werden, dass Signale, welche kleiner als die Beads sind, keine Zellen sind. Diese Population lässt sich aus den Kanälen FSC-A und SSC-A bestimmen. Der FSC-W-Kanal spiegelt in etwa die Breite einer signalgebenden Struktur wider. Bei Signalen von weit über 100K im FSC-W-Kanal muss davon ausgegangen werden, dass dies durch Adhäsion einzelner Strukturen zustande gekommen ist, wodurch diese Signale für die Betrachtung von einzelnen Zellen uninteressant werden. Bei den nun verbliebenen Signalen kann angenommen werden, dass sie die Zellen der betrachteten Gewebe darstellen. Die Population wird nun nach APC-A und GFP-A aufgetragen. Im APC-A-Kanal stellen sich CD11b-positiv gefärbte Zellen dar, im GFP-A-Kanal CX3CR1-positive. Die erhaltenen Zellpopulationen werden nach der Intensität der Signale in negative, intermediate und positive Zellen unterteilt und können anhand der Ausprägung der einzelnen Merkmale unterschiedlichen Zelltypen zugeordnet werden.

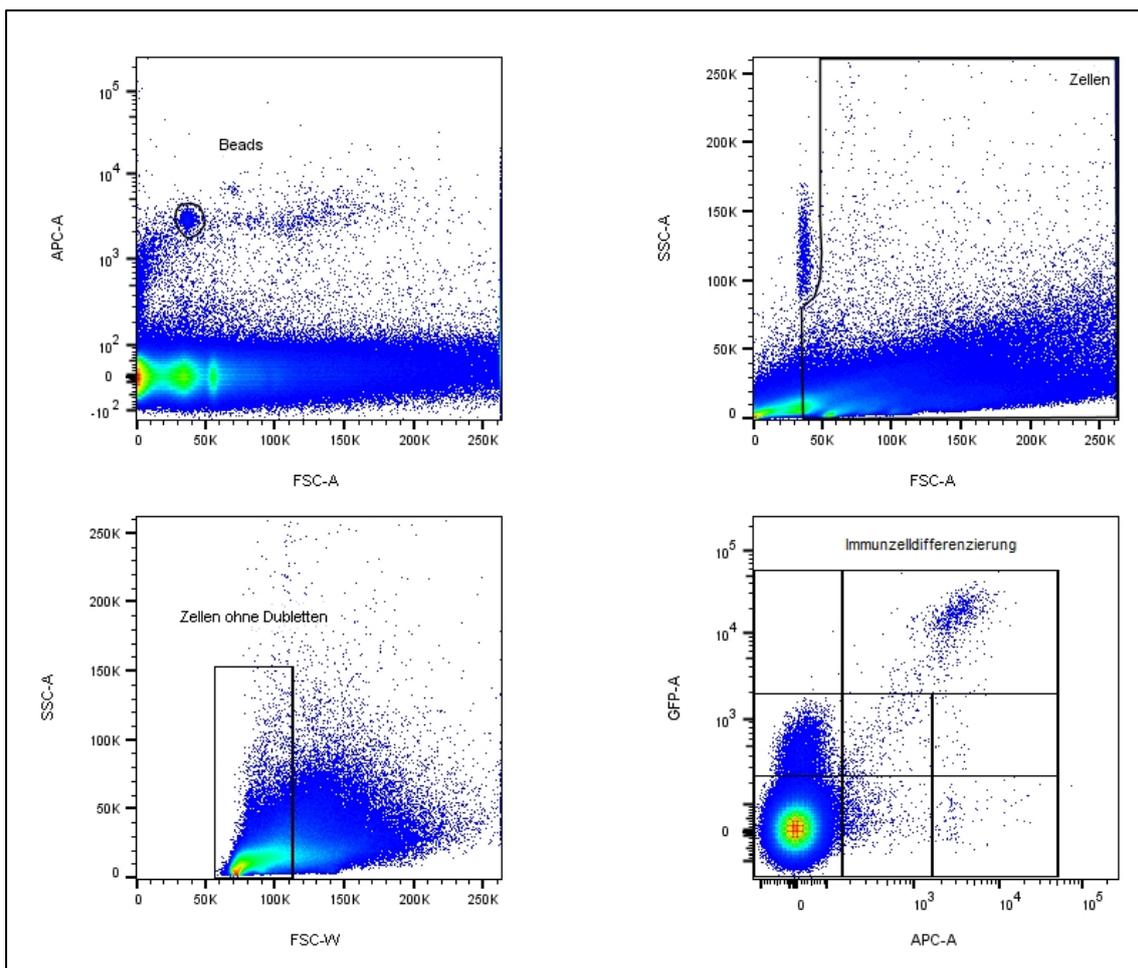


Abbildung 5: Beispiel zum Vorgehen zur Differenzierung der Immunzellen

So werden anhand der Oberflächenmarker CX3CR1 und CD11b und der von Eter et al. vorgestellten Methode zur Differenzierung von Immunzellen die durchflusszytometrisch detektierten Zellen in neutrophile Granulozyten (CX3CR1 negativ, CD11b positiv), Makrophagen (CX3CR1 intermediate, CD11b positiv), Mikrogliazellen (CX3CR1 positiv, CD11b positiv) und dendritische Zellen (CX3CR1 positiv, CD11b intermediate) unterteilt [37]. Nach dieser Einteilung wären auch CX3CR1 intermediate, CD11b negative Zellen den dendritischen Zellen zuzuordnen. Da diese Population jedoch einen fließenden Übergang zur Population der Zellen ohne spezifische Marker aufweist und somit diese Populationen mit den verwendeten Oberflächenmarkern nicht eindeutig abgrenzbar ist, werden im Folgenden nur CX3CR1 intermediate, CD11b intermediate als dendritische Zellen bezeichnet (vgl. Abbildung 5).

CX3CR1 positiv, CD11b negativ  keine Population	CX3CR1 positiv, CD11b intermediate  <b>Monozyten</b>	CX3CR1 positiv, CD11b positiv
CX3CR1 intermediate, CD11b negativ  nicht eindeutig abgrenzbare Population	CX3CR1 intermediate, CD11b intermediate  <b>dendritische Zellen</b>	CX3CR1 intermediate, CD11b positiv  <b>Makrophagen</b>
CX3CR1 negativ, CD11b negativ  Zellen ohne spezifischen Marker	CX3CR1 negativ, CD11b intermediate  unbestimmte Population	CX3CR1 negativ, CD11b positiv  neutrophile Granulozyten

**Tabelle 3: Zelldifferenzierung Choroidea (adaptiert nach Eter et al. [37])**

CX3CR1 positiv, CD11b negativ  keine Population	CX3CR1 positiv, CD11b intermediate  <b>Mikroglia</b>	CX3CR1 positiv, CD11b positiv
CX3CR1 intermediate, CD11b negativ  nicht eindeutig abgrenzbare Population	CX3CR1 intermediate, CD11b intermediate  <b>dendritische Zellen</b>	CX3CR1 intermediate, CD11b positiv  <b>Makrophagen</b>
CX3CR1 negativ, CD11b negativ  Zellen ohne spezifischen Marker	CX3CR1 negativ, CD11b intermediate  unbestimmte Population	CX3CR1 negativ, CD11b positiv  neutrophile Granulozyten

**Tabelle 4: Zelldifferenzierung Retina (adaptiert nach Eter et al. [37])**

Sowohl Monozyten des Blutes als auch die Mikrogliazellen tragen die Oberflächenmarker CX3CR1 und CD11b. Als Zellen des zentralen Nervensystems sind Mikrogliazellen am Auge in der Retina zu finden [1, 84]. Die in der Choroidea gefundenen Zellen mit den gleichen Oberflächenmarkern sehen wir als Monozyten des Blutes an. Für die Retina konnten Combadière et al. bereits nachweisen, dass Mikrogliazellen die einzigen CX3CR1-exprimierenden Zellen dieser Schicht sind [29].

Daher werden im Folgenden alle CX3CR1-positiven Zellen der Retina als Mikrogliazellen bezeichnet und alle CX3CR1-positiven der Choroidea den Monozyten zugeordnet. Ein Überblick zur Zelldifferenzierung ist in Tabelle 3 und Tabelle 4 dargestellt.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen erfolgen in fünf Experimentreihen an insgesamt 70 Mäusen, wobei sich zusammengenommen 16 Tiere in der Kontrollgruppe und 54 Tiere in den Experimentgruppen finden.

### **3.5 Empirische Methode**

Bei den durchzuführenden Experimenten werden jeweils zwei Gruppen unterschiedlichen Behandlungen zugeführt. Für den Einfluss von Pioglitazon auf die untersuchten Parameter werden beide Gruppen täglich per oraler Gavage gefüttert. Die eine Gruppe erhält eine Cellulose-Lösung und dient als Kontrollgruppe, die zweite Gruppe erhält als Zusatz in der Cellulose-Lösung Pioglitazon. Die betrachteten Parameter beider Gruppen werden in den folgenden Analysen zu unterschiedlichen Zeitpunkten miteinander verglichen. Dabei wird mittels des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests getestet, ob zwischen den Gruppen hinsichtlich des jeweils betrachteten Merkmals ein signifikanter Unterschied besteht. Für diesen Test muss die abhängige Variable mindestens ordinalskaliert sein und es müssen voneinander unabhängige Stichproben vorliegen [96, 147]. Beide Voraussetzungen sind hier erfüllt. Der Mann-Whitney-U-Test wird verwendet, da die vorliegenden Daten keine Normalverteilung aufweisen und dieser Test die Verletzung der Normalverteilungsannahme toleriert [96, 147]. Darüber hinaus eignet sich der Mann-Whitney-U Test zum Vergleich von Medianen, welches bei den vorliegenden Daten das zu empfehlende Vergleichsmaß ist, da es weniger sensibel auf das Vorliegen von Ausreißern in den Daten reagiert [87]. Diese sind im vorliegenden Datensatz aufgrund der geringen Stichprobengröße, welche sich durch die Restriktionen der Anzahl der Versuchstiere bei Tierversuchen erklärt, nicht auszuschließen. Der Mann-Whitney-U

Test basiert auf einer Rangreihung der Daten, was bedeutet, dass nicht die Messwerte selbst, sondern die jeweiligen Ränge verglichen werden [147]. Dies bedeutet auch, dass Ausreißer weniger ins Gewicht fallen [147]. Aus den Rängen aller Beobachtungen werden Rangsummen für die einzelnen Gruppen gebildet [147]. Dies geschieht über die Addition der einzelnen Ränge innerhalb der Gruppe [147]. Aus den Rangsummen und der Stichprobengröße wird anschließend die Teststatistik berechnet [147]. Der nach z-Standardisierung erhaltene empirische z-Wert kann durch Vergleichen mit dem theoretischen Wert der Z-Verteilung auf Signifikanz, also Verallgemeinerbarkeit über die Stichprobe hinaus auf die Grundgesamtheit, geprüft werden [147].

Zur Darstellung der jeweiligen Signifikanzen im Rahmen der Aufarbeitung der Ergebnisse wird folgende Notation verwendet:

<b>Signifikanzniveau (p-Wert)</b>	<b>Interpretation</b>	<b>Notation</b>
<0,05	Signifikant	*

## 4 Ergebnisse

### 4.1 In-vitro Durchflusszytometrie

Ziel der in-vitro-Voruntersuchungen ist es, den Einfluss von Pioglitazon auf Zellkulturen humaner retinaler Endothelzellen (hREZ) zu untersuchen. Das Augenmerk wird hierbei auf die absolute Zahl apoptotischer Zellen, den MFI, sowie die aus der MFI errechneten Teilungszyklen gerichtet, um einerseits eine Aussage bezüglich der unter Pioglitazon auftretenden Apoptose, andererseits eine Aussage bezüglich einer etwaigen veränderten Proliferationsrate treffen zu können.

Zunächst werden die Mediane der absoluten Zellzahlen von Höchst-gefärbten Zellpopulationen bei unterschiedlichen Konzentrationen von Pioglitazon verglichen (vgl. Abbildung 6). Hier finden sich zu keinem der gemessenen Zeitpunkte signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Somit gibt es keinen Anhalt für eine erhöhte Apoptoserate von hREZ unter Pioglitazoneinfluss.

Auch bei Betrachtung des MFI der CFSE-gefärbten Zellen zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (vgl. Abbildung 7). Die hierüber mögliche Berechnung der Teilungszyklen legt nahe, dass Pioglitazon keinen Einfluss auf die Proliferationsrate gesunder hREZ hat (vgl. Abbildung 8).

Diese Annahme wird weiter bestätigt durch die gezielte Betrachtung der Teilungszyklen der Kontrollgruppe, DMSO-Kontrollgruppe sowie der Pioglitazongruppe mit der höchsten Konzentration (Pio80). Hier zeigen sich von Zeitpunkt 1 (24h) zu Zeitpunkt 2 (48h), von Zeitpunkt 2 (48h) zu Zeitpunkt 3 (72h), sowie von Zeitpunkt 1 (24h) zu Zeitpunkt 3 (72h) keine signifikanten Veränderungen (vgl. Abbildung 9).

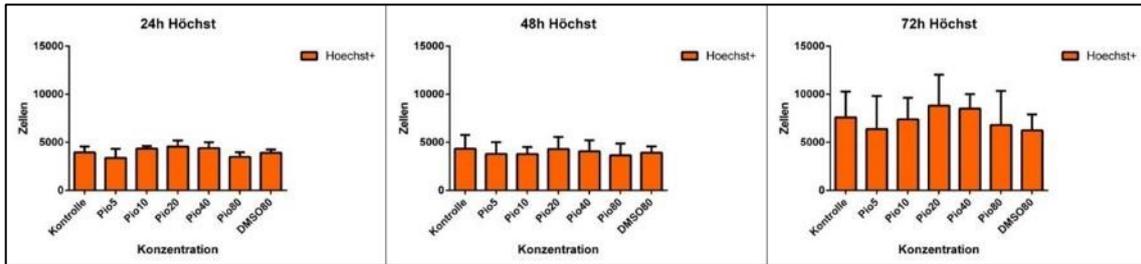


Abbildung 6: Mediane der absoluten Zellzahlen Höchst-gefärbter Zellen unter den unterschiedlich behandelten Gruppen nach 24h, 48h und 72h (von links nach rechts)

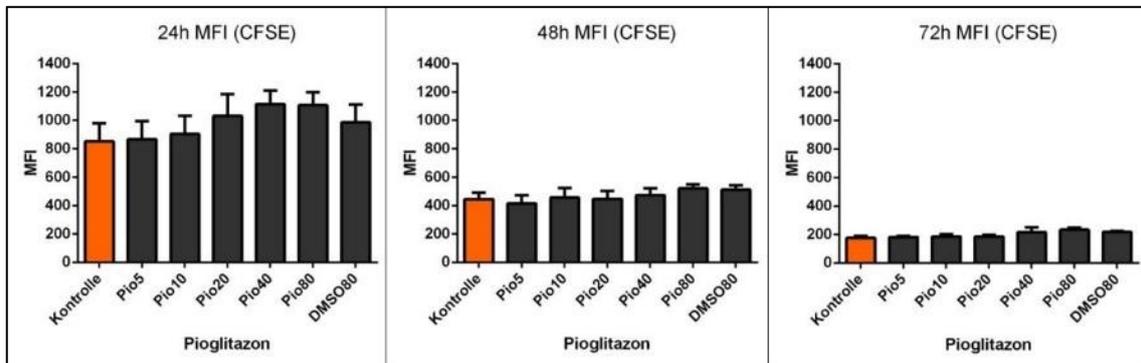


Abbildung 7: Mediane der MFI-Werte CFSE gefärbter Zellen unter den unterschiedlich behandelten Gruppen nach 24h, 48h und 72h (von links nach rechts)

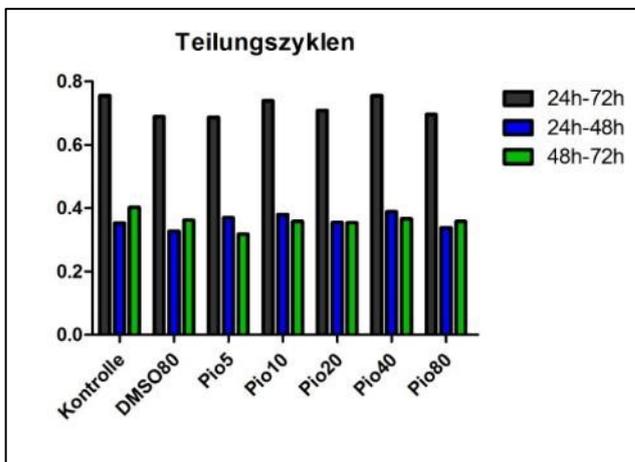


Abbildung 8: Überblick Teilungszyklen der hREZ-Zellen in Zellkultur

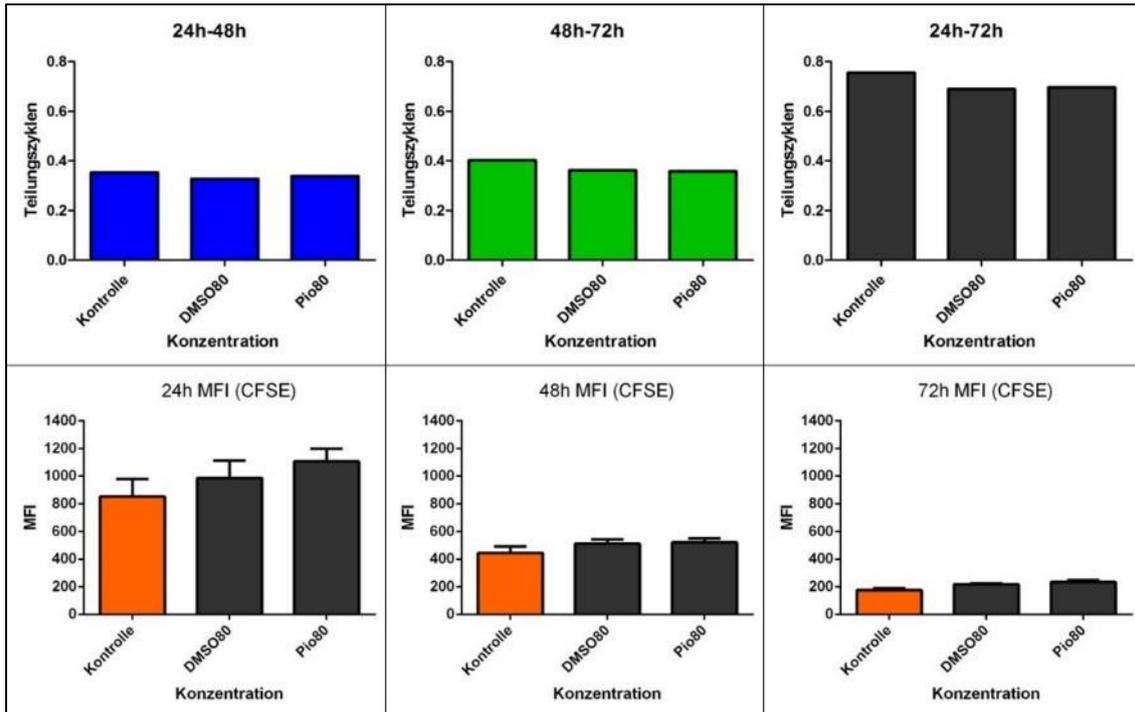


Abbildung 9: oben: Teilungszyklen [Kontrolle, DMSO80, Pio80] nach 24h, 48h und 72h (von links nach rechts); unten: Mediane MFI-Werte CFSE-gefärbter Zellen [Kontrolle, DMSO80, Pio80] nach 24h, 48h und 72h (von links nach rechts)

## 4.2 Ex-vivo Durchflusszytometrie

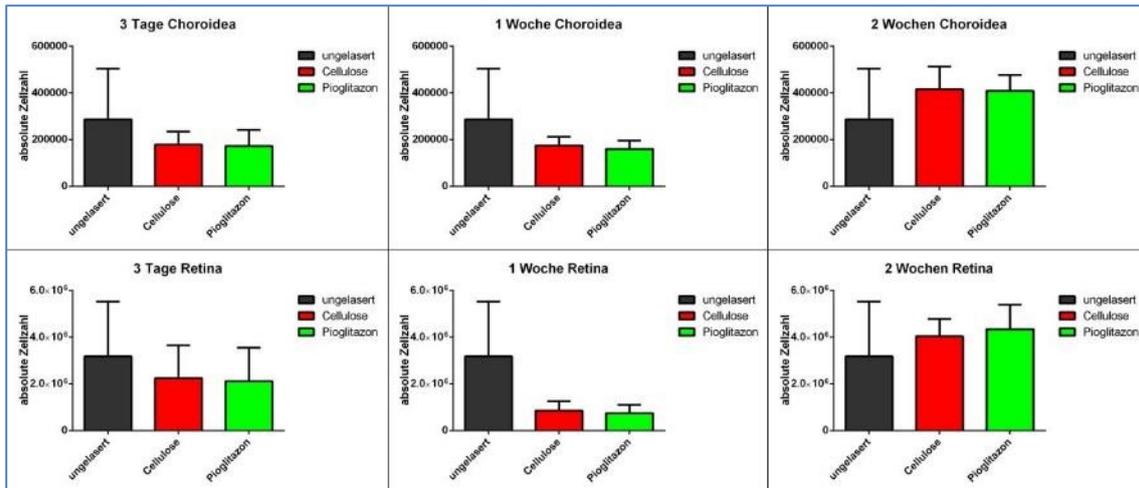
Ziel der durchflusszytometrischen Untersuchungen ist es, den Einfluss des Wirkstoffes Pioglitazon auf die Zahl der in Retina und Choroidea vorhandenen Immunzellen zu beleuchten, sowie den Anteil der Immunzellen an der Gesamtzellzahl zu untersuchen und die beteiligten Immunzellen weiter zu differenzieren.

### 4.2.1 Kontrolle des Modells

In Vorversuchen zur Wirksamkeit des Mausmodelles, in welchen ungelaserte, unbehandelte Mauseugen mit gelaserten, unbehandelten Mauseugen verglichen werden, zeigt sich, dass durch die Laserbehandlung sowohl die Anzahl der Immunzellen, als auch der Anteil der Immunzellen an den Gesamtzellen vor allem in der Choroidea nach zwei Wochen zunimmt (vgl. Abbildung 11, Abbildung 12, Abbildung 13, Abbildung 14 und Abbildung 15). Dies deckt sich auch mit ähnlichen bislang durchgeführten Untersuchungen, unter anderem durch Eter et al. und Krause et al. [37, 75]. Bei der deskriptiven Betrachtung der Mediane zeigt sich auch eine von der Tendenz her deutliche Abnahme der Gesamtzellzahl sowohl in der Choroidea als auch in der Retina, welcher in der statistischen Analyse jedoch keine Signifikanz aufweist (vgl. Abbildung 10). Der Effekt zeigt sich bereits nach drei Tagen, nimmt seine stärkste Ausprägung jedoch nach einer Woche an. Am stärksten ist dieser Effekt in der Retina zu beobachten. So findet sich hier eine Woche nach Laserbehandlung eine Verringerung der Gesamtzellzahl um den Faktor 0,256 ( $p=0,054$ )<sup>20</sup> (vgl. Abbildung 10). Dies erschwert den Vergleich der Anteile der Immunzellen an der Gesamtzellzahl, weshalb im Folgenden sowohl die absoluten Zellzahlen, als auch der Anteil der Immunzellen an der Gesamtzellzahl angegeben werden. Auffällig ist die deutlich höhere Standardabweichung in der Gruppe der ungelaserten Augen (Choroidea: Mittelwert = 286.903, Standardabweichung = 217.072; Retina: Mittelwert = 3.175.302, Standardabweichung = 2.341.609).

---

<sup>20</sup> Der Faktor errechnet sich aus dem Quotienten der Mediane der absoluten Zellzahlen: Der angegebene p-Wert bezieht sich auf die Signifikanzanalyse der Medianwerte anhand des Mann-Whitney-U-Testes.



**Abbildung 10: Ergebnisse des Medianvergleichs der Gesamtzellzahl in Choroidea (oben) und Retina (unten) in Abhängigkeit der Laserbehandlung im Zeitablauf**

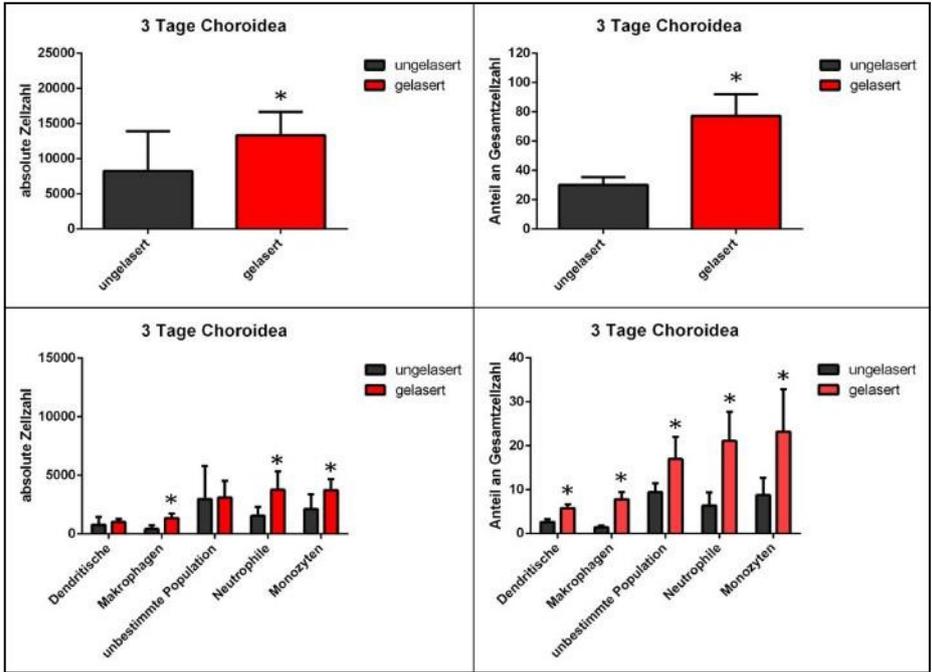
Nach drei Tagen nimmt die absolute Zahl an Immunzellen in der Choroidea um den Faktor 2,23 zu ( $p=0,031$ ) (vgl. Abbildung 11). Der Anteil der Immunzellen an den Gesamtzellen nimmt um den Faktor 2,535 zu ( $p<0,000$ ). Dieser Anstieg betrifft sowohl die absolute Anzahl von Makrophagen (Faktor 4,360,  $p<0,000$ ), neutrophilen Granulozyten (Faktor 2,195,  $p=0,001$ ) und Monozyten (Faktor 4,360,  $p=0,006$ ), als auch deren Anteil an der Gesamtzellzahl (Makrophagen: Faktor 5,269,  $p<0,000$ ; neutrophile Granulozyten: Faktor 3,043,  $p<0,000$ ; Monozyten: Faktor 3,387,  $p<0,000$ ). Ebenso nehmen die Anteile der dendritischen Zellen und der Zellen der unbestimmten Population an den Gesamtzellen zu (Dendritische: Faktor 2,260,  $p<0,000$ , Unbestimmte: Faktor 1,611,  $p=0,001$ ). Die absoluten Zellzahlen von dendritischen Zellen und Zellen der unbestimmten Population zeigen jedoch keinen signifikanten Anstieg.

Nach einer Woche ist die absolute Zahl an Immunzellen um den Faktor 2,15 erhöht ( $p=0,042$ ) (vgl. Abbildung 12). Der Anteil der Immunzellen an den Gesamtzellen ist weiterhin erhöht, hier um den Faktor 2,472 ( $p<0,000$ ). In Bezug auf die einzelnen Immunzellen zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den nach drei Tagen entnommenen Augen. Die Erhöhung betrifft vor allem die absolute Anzahl von Makrophagen (Faktor 4,114,  $p=0,002$ ), neutrophilen Granulozyten (Faktor 1,740,  $p=0,005$ ) und Monozyten (Faktor 2,627,  $p=0,016$ ), sowie deren Anteil an der Gesamtzellzahl (Makrophagen: Faktor 4,481,  $p<0,000$ ; neutrophile Granulozyten: Faktor 2,109,  $p<0,000$ ; Monozyten: Faktor 3,741,  $p=0,001$ ). Auch nach einer Woche sind die Anteile der dendritischen Zellen und der Zellen der unbestimmten Population an den Gesamtzellen erhöht (Dendritische: Faktor 2,044,  $p=0,001$ , Unbestimmte: Faktor 1,701,  $p<0,000$ ). Die absoluten Zellzahlen

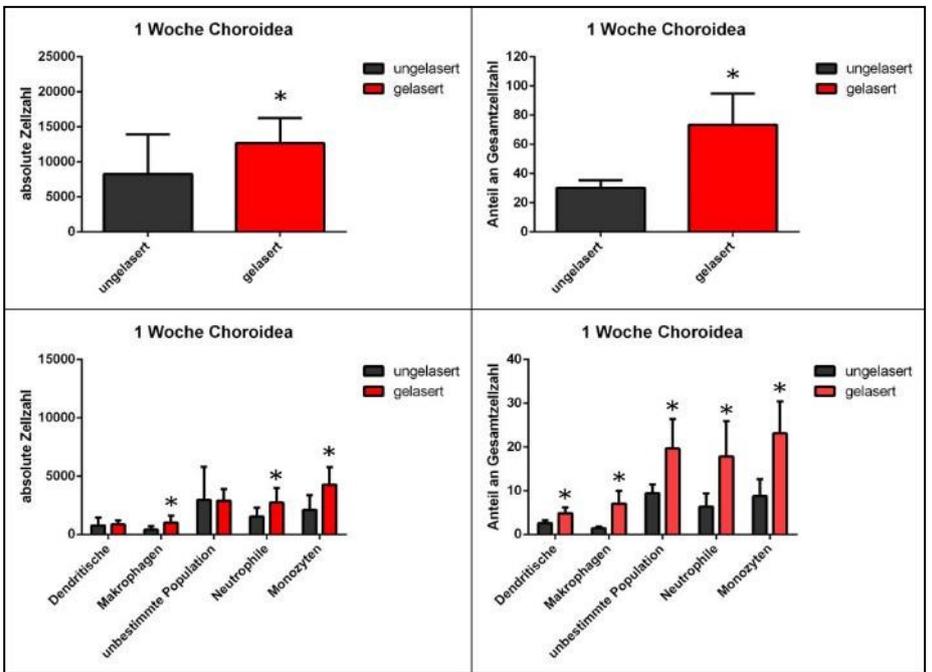
von dendritischen Zellen und Zellen der unbestimmten Population zeigen wiederum keine signifikante Erhöhung.

Nach zwei Wochen ist die absolute Zahl an Immunzellen um den Faktor 3,13 im Vergleich zu den ungelaserten Augen erhöht ( $p=0,004$ ) (vgl. Abbildung 13). Der Anteil der Immunzellen an den Gesamtzellen ist um den Faktor 1,790 erhöht ( $p=0,004$ ), im Vergleich zu dem nach einer Woche beobachteten Anteil jedoch rückläufig. Dieser erhöhte Anteil lässt sich zu diesem Zeitpunkt vor allem auf die unbestimmte Population zurückführen. Diese zeigt bei ihrer absoluten Zellzahl einen signifikanten Anstieg um den Faktor 4,467 ( $p=0,002$ ) durch die Laserbehandlung im Vergleich zu den ungelaserten Augen. Auch der Anteil an den Gesamtzellen nimmt mit einem Faktor von 2,247 ( $p=0,001$ ) signifikant zu. Ebenso zeigen die dendritischen Zellen mit einer Zunahme um den Faktor 4,775 ( $p=0,017$ ) gegenüber den ungelaserten Augen einen weiteren signifikanten Anstieg bei den absoluten Zahlen, sowie mit einem weiterhin, um den Faktor 1,915 ( $p=0,004$ ) signifikant erhöhten Anteil an den Gesamtzellen. Die absoluten Zellzahlen von Makrophagen (Faktor 2,295,  $p=0,017$ ) und Monozyten (Faktor 2,543,  $p=0,017$ ) zeigen weiterhin eine signifikante Erhöhung gegenüber nicht gelaserten Augen, nicht jedoch ihr Anteil an der Gesamtzellzahl. Neutrophile Granulozyten zeigen zu diesem Zeitpunkt keine signifikanten Veränderungen mehr und haben sich dem Niveau nicht gelasertes Augen angeglichen.

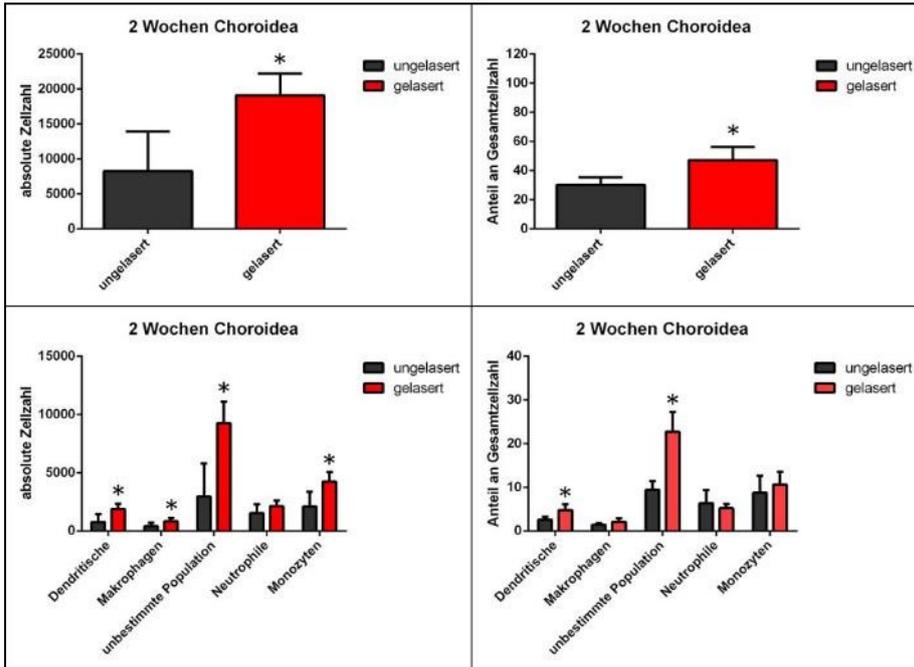
In Abbildung 14 und Abbildung 15 zeigt sich im zeitlichen Verlauf, dass sich neutrophile Granulozyten und Makrophagen sowohl in Bezug auf ihre absolute Zellzahl, wie auch als Anteil an der Gesamtzellzahl, wieder den Werten ungelasertes Augen annähern. In Bezug auf den Anteil an der Gesamtzellzahl gilt dies auch für die Populationen der Monozyten und dendritischen Zellen. Einen weiteren Anstieg, sowohl in Bezug auf die absolute Zellzahl, wie auch auf den Anteil an der Gesamtzellzahl zeigt nur die unbestimmte Population.



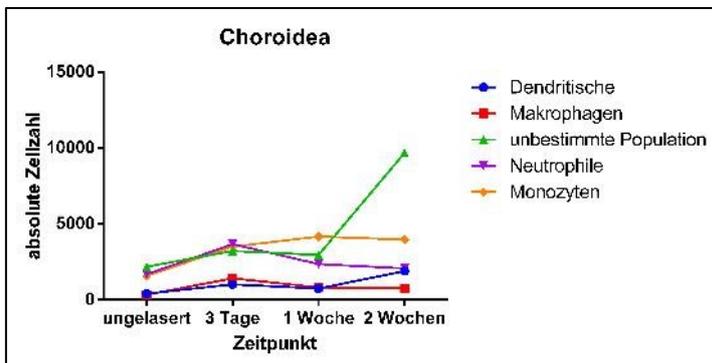
**Abbildung 11: Laserbedingte Veränderungen der Anzahl von Immunzellen sowie deren Anteil an der Gesamtzellzahl bei Entnahme der Augen drei Tage nach Laserbehandlung; oben: Immunzellen gesammelt; unten: einzelne Immunzellen [Anteil an Gesamtzellzahl in Promille]**



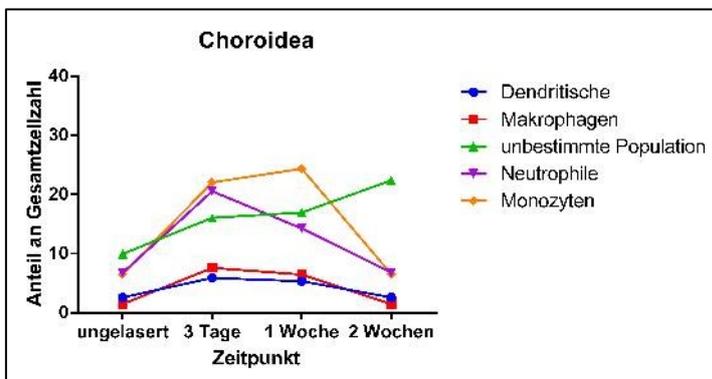
**Abbildung 12: Laserbedingte Veränderungen der Anzahl von Immunzellen sowie deren Anteil an der Gesamtzellzahl bei Entnahme der Augen eine Woche nach Laserbehandlung; oben: Immunzellen gesammelt; unten: einzelne Immunzellen [Anteil an Gesamtzellzahl in Promille]**



**Abbildung 13: Laserbedingte Veränderungen der Anzahl von Immunzellen sowie deren Anteil an der Gesamtzellzahl bei Entnahme der Augen zwei Wochen nach Laserbehandlung; oben: Immunzellen gesammelt; unten: einzelne Immunzellen [Anteil an Gesamtzellzahl in Promille]**



**Abbildung 14: Zeitverlauf des Medians der absoluten Zellzahl einzelner Immunzellpopulationen in der Choroidea nach Laserbehandlung**



**Abbildung 15: Zeitverlauf des Medians des Anteils einzelner Immunzellpopulationen an der Gesamtzellzahl in der Choroidea nach Laserbehandlung [Anteil an Gesamtzellzahl in Promille]**

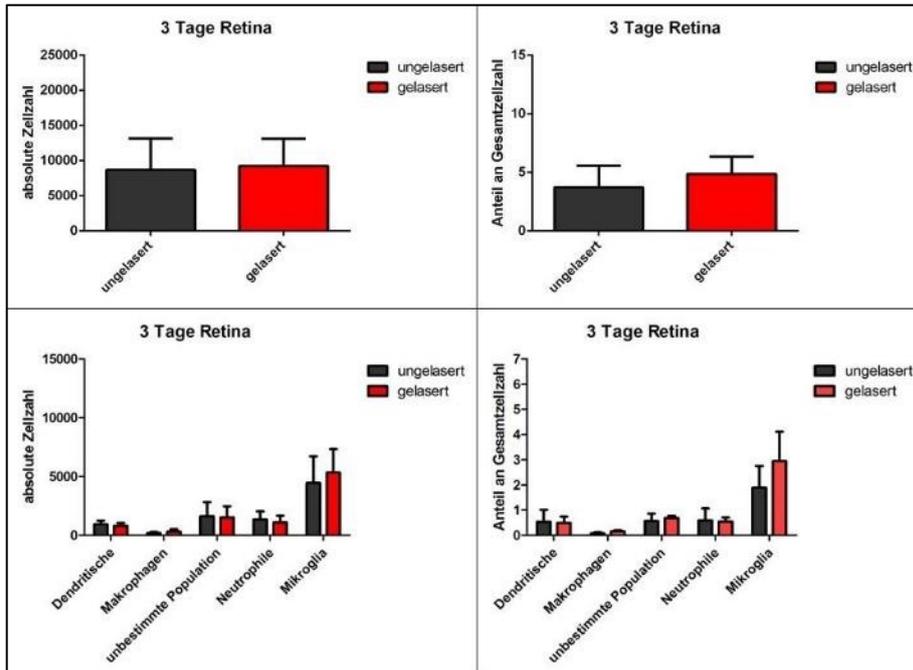
In der Retina zeigt sich der Einfluss der Laserbehandlung auf die Anzahl der Immunzellen erst nach zwei Wochen (vgl. Abbildung 18, Abbildung 19 und Abbildung 20). Zu diesem Zeitpunkt hat sich die absolute Anzahl der Immunzellen um den Faktor 2,37 erhöht ( $p=0,001$ ).

Drei Tage nach Laserbehandlung finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen gelaserten und ungelaserten Tieren (vgl. Abbildung 16).

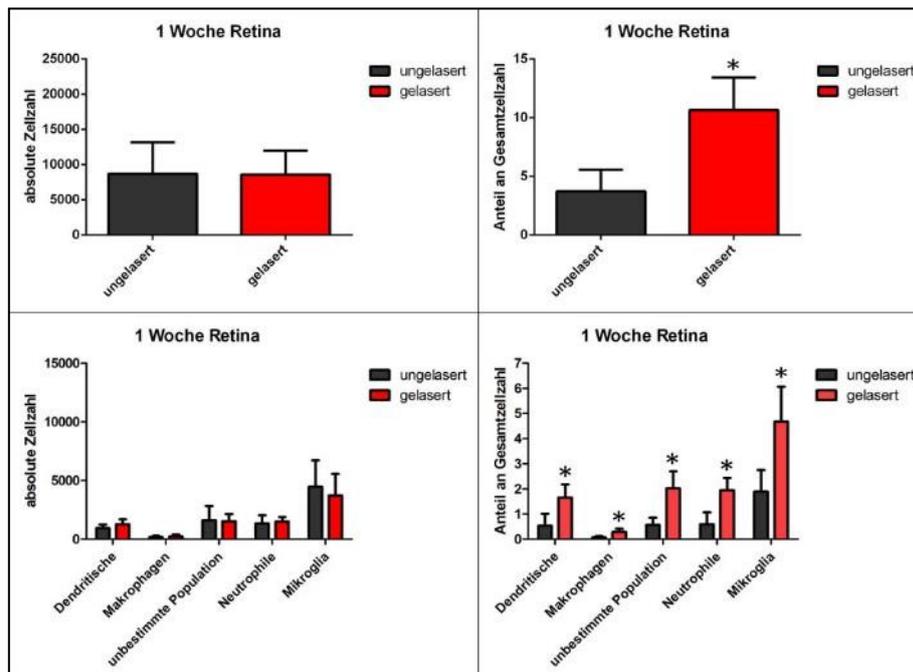
Eine Woche nach der Laserbehandlung ist der Anteil der Immunzellen an der Gesamtzellzahl bereits deutlich erhöht (Faktor 3,825,  $p<0,001$ ) (vgl. Abbildung 17), bei konstant bleibender absoluter Zellzahl und alle Immunzellpopulationen betreffend ist dies jedoch am ehesten auf die bereits erwähnte initiale Verringerung der Gesamtzellzahl nach Laserbehandlung zurückzuführen (Abbildung 10, Abbildung 17, Abbildung 19 und Abbildung 20).

Als die bedeutendste Immunzelle der Retina nimmt die Anzahl der Mikrogliazellen zwei Wochen nach Laserbehandlung um den Faktor 2,407 ( $p=0,002$ ) zu. Die Anzahl der Zellen der unbestimmten Population nimmt um den Faktor 2,990 ( $p=0,002$ ) zu und die der dendritischen Zellen um 2,476 ( $p=0,001$ ). Den höchsten prozentualen Anstieg weisen die Makrophagen auf (Faktor 3,567;  $p=0,001$ ), insgesamt machen diese jedoch auch nach Laserbehandlung weniger als 3% der Immunzellen der Retina aus, weshalb sie nur unwesentlich zur Steigerung der absoluten Immunzellzahl beitragen. Auch die neutrophilen Granulozyten sind hierbei mit einer nicht signifikanten, leichten Erhöhung der Zellzahl um den Faktor 1,203 ( $p=0,097$ ) nur marginal beteiligt (vgl. Abbildung 18).

Der zeitliche Verlauf der einzelnen Immunzellpopulationen nach Laserbehandlung ist in Abbildung 19 und Abbildung 20 dargestellt. Insbesondere für die Mikrogliazellen ist hier der massive Anstieg der absoluten Immunzellzahl zwei Wochen nach Laserbehandlung zu erkennen.



**Abbildung 16: Laserbedingte Veränderungen der Anzahl von Immunzellen sowie deren Anteil an der Gesamtzellzahl bei Entnahme der Augen drei Tage nach Laserbehandlung; oben: Immunzellen gesammelt; unten: einzelne Immunzellen [Anteil an Gesamtzellzahl in Promille]**



**Abbildung 17: Laserbedingte Veränderungen der Anzahl von Immunzellen sowie deren Anteil an der Gesamtzellzahl bei Entnahme der Augen eine Woche nach Laserbehandlung; oben: Immunzellen gesammelt; unten: einzelne Immunzellen [Anteil an Gesamtzellzahl in Promille]**

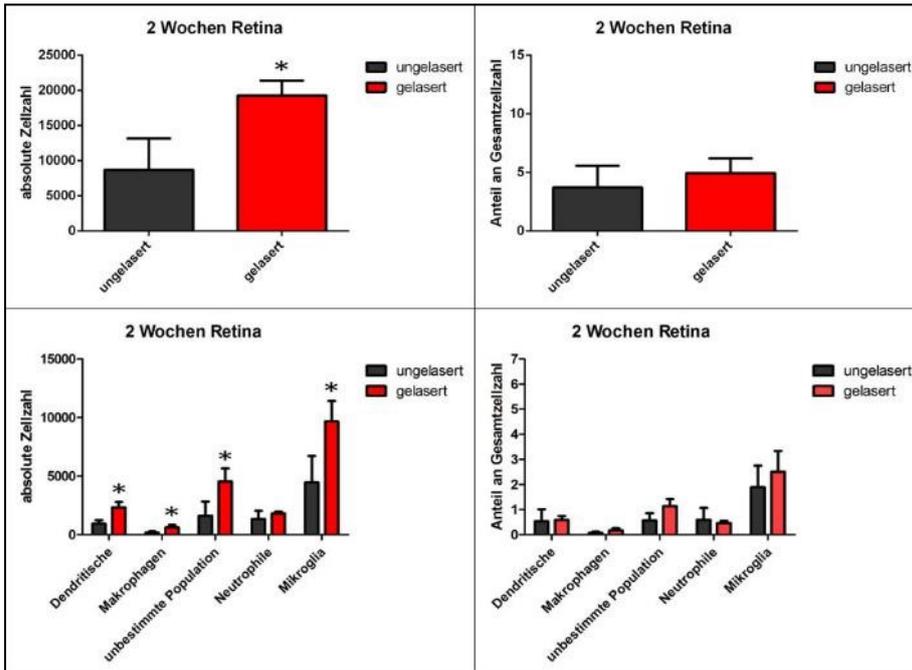


Abbildung 18: Laserbedingte Veränderungen der Anzahl von Immunzellen sowie deren Anteil an der Gesamtzellzahl bei Entnahme der Augen zwei Wochen nach Laserbehandlung; oben: Immunzellen gesammelt; unten: einzelne Immunzellen [Anteil an Gesamtzellzahl in Promille]

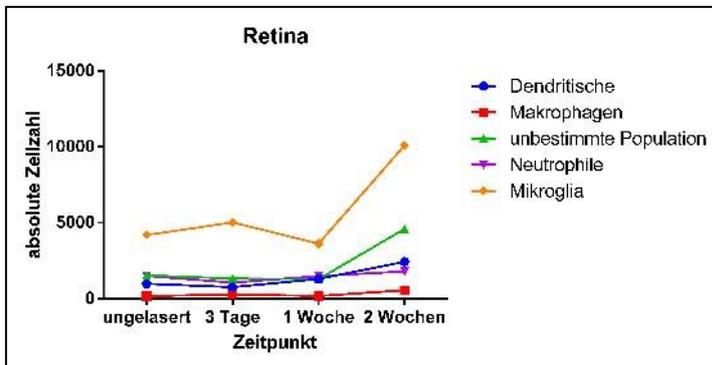


Abbildung 19: Zeitverlauf des Medians der absoluten Zellzahl einzelner Immunzellpopulationen in der Retina nach Laserbehandlung

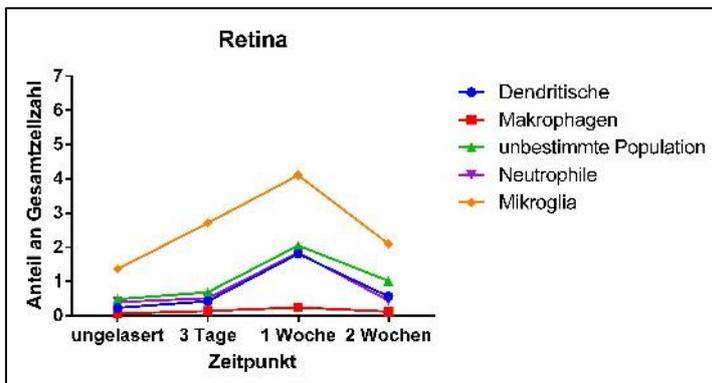
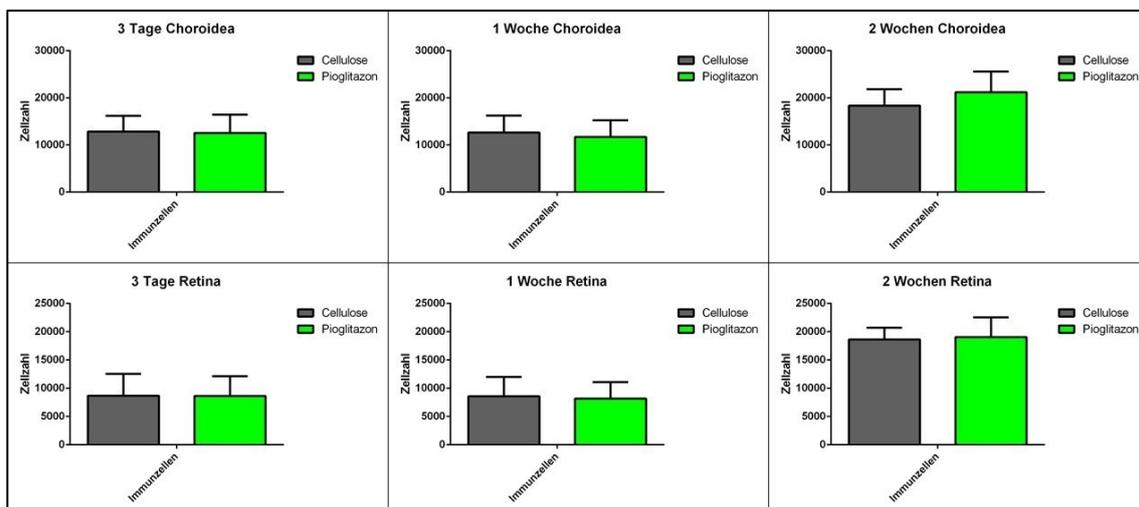


Abbildung 20: Zeitverlauf des Medians des Anteils einzelner Immunzellpopulationen an der Gesamtzellzahl in der Retina nach Laserbehandlung [Anteil an Gesamtzellzahl in Promille]

## 4.2.2 Pioglitazon- und Celluloseapplikation

In der durchflusszytometrischen Untersuchung zeigt sich allenfalls ein geringer Einfluss von Pioglitazon auf die absoluten Immunzellzahlen (vgl. Abbildung 21, Abbildung 22, Abbildung 23 und Abbildung 24). Nach einer Woche findet sich in der Choroidea unter Einfluss der Pioglitazonbehandlung eine signifikant verringerte Anzahl an neutrophilen Granulozyten (Faktor 0,640;  $p=0,028$ )<sup>21</sup>, sowie eine Tendenz zu einer verringerten Anzahl von dendritischen Zellen (Faktor 0,609;  $p=0,093$ ) in der Retina. Der zeitliche Verlauf der absoluten Zellzahl neutrophiler Granulozyten, sowie deren Anteil an der Gesamtzellzahl ist in Abbildung 29 und Abbildung 30 dargestellt. Die Gesamtheit der Immunzellen weist in keinem der Gewebe eine statistisch signifikante Veränderung auf. Auch in Bezug auf die Verhältnisse der einzelnen Immunzellpopulationen zueinander erfolgt durch die Gabe von Pioglitazon keine Änderung.

Unter Einfluss von Pioglitazon finden sich keine Veränderungen an der Zahl der Mikrogliazellen in der Retina. Dies kann über alle gemessenen Zeitpunkte gezeigt werden. Dies lässt sich für die Choroidea auch aus den annähernd gleich verlaufenden Kurven des in Abbildung 14 und Abbildung 15, sowie Abbildung 25 und Abbildung 26 dargestellten zeitlichen Verlaufes nach Laserbehandlung erkennen. Für die Retina ist dieser Verlauf in Abbildung 19 und Abbildung 20, sowie Abbildung 27 und Abbildung 28 dargestellt.



**Abbildung 21: Veränderung der absoluten Immunzellzahl gelaserter Augen unter Behandlung mit Pioglitazon [oben: Choroidea; unten: Retina; von links nach rechts: 3 Tage, eine Woche, zwei Wochen]**

<sup>21</sup> Der Faktor errechnet sich aus dem Quotienten der Mediane der absoluten Zellzahlen: Der angegebene p-Wert bezieht sich auf die Signifikanzanalyse der Medianwerte anhand des Mann-Whitney-U-Testes.

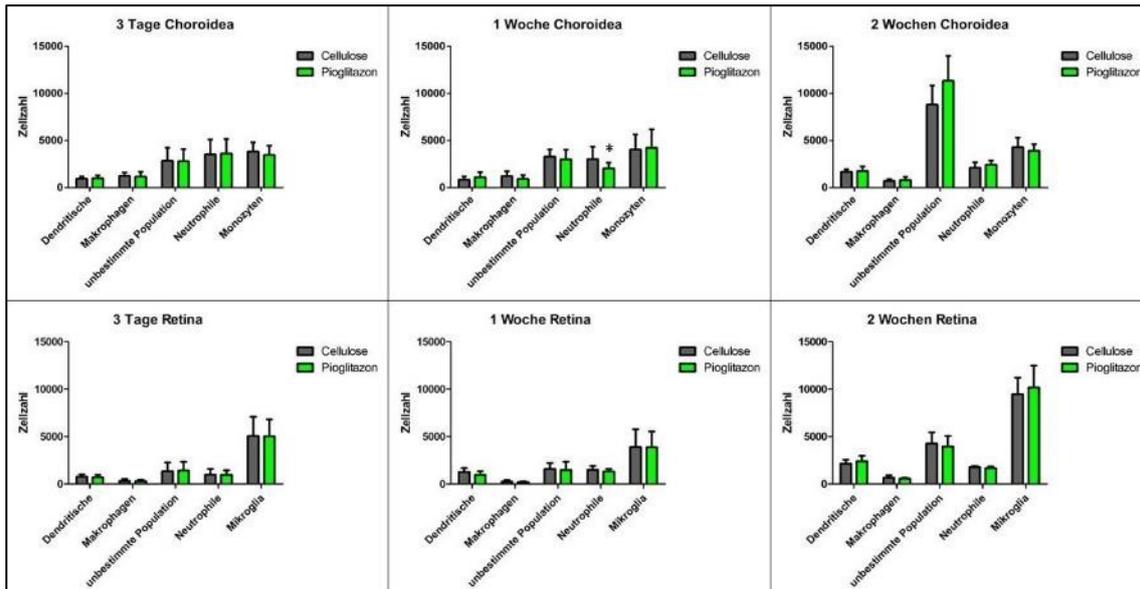


Abbildung 22: Veränderung einzelner Immunzellpopulationen gelaserter Augen unter Behandlung mit Pioglitazon [oben: Choroida; unten: Retina; von links nach rechts: 3 Tage, eine Woche, zwei Wochen]

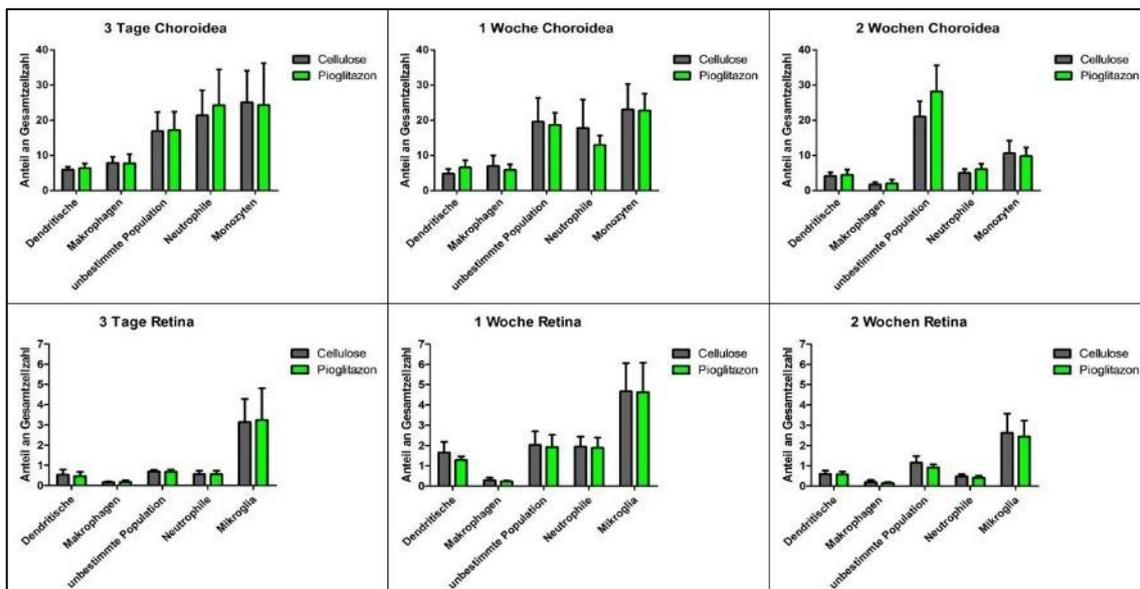


Abbildung 23: Veränderung der Verhältnisse der einzelnen Immunzellpopulationen gelaserter Augen zur Gesamtzellzahl unter Behandlung mit Pioglitazon [oben: Choroida; unten: Retina; von links nach rechts: 3 Tage, eine Woche, zwei Wochen; Anteil an Gesamtzellzahl in Promille]

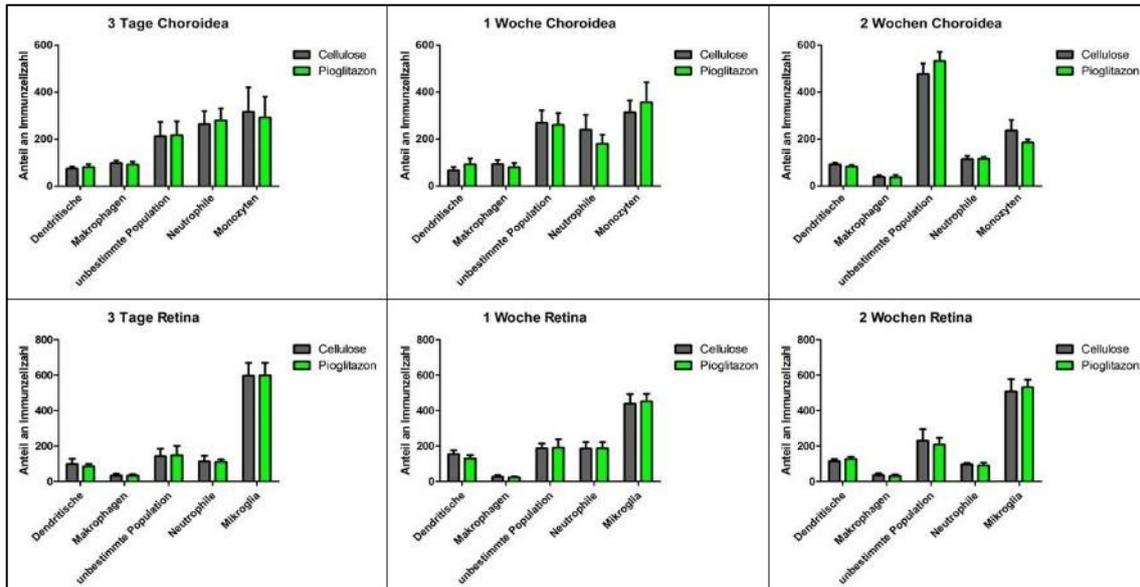


Abbildung 24: Veränderung der Verhältnisse der einzelnen Immunzellpopulationen gelaserter Augen zum Anteil an der Zahl der Immunzellen unter Behandlung mit Pioglitazon [oben: Choroidea; unten: Retina; von links nach rechts: 3 Tage, eine Woche, zwei Wochen; Anteil an Immunzellzahl in Promille]

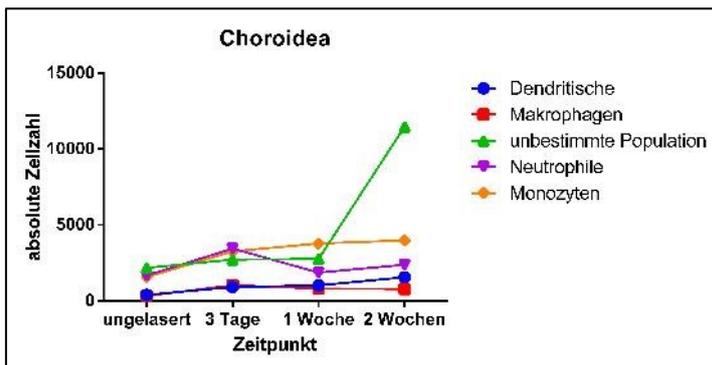


Abbildung 25: Zeitverlauf des Medians der absoluten Zellzahl einzelner Immunzellpopulationen in der Choroidea unter Pioglitazon- und Laserbehandlung

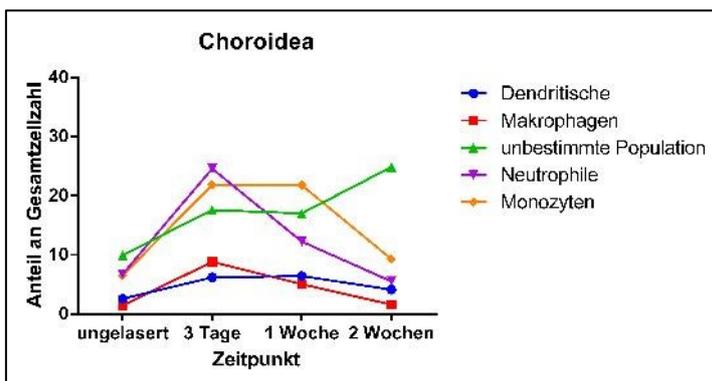


Abbildung 26: Zeitverlauf des Medians des Anteils einzelner Immunzellpopulationen an der Gesamtzellzahl in der Choroidea unter Pioglitazon- und Laserbehandlung [Anteil an Gesamtzellzahl in Promille]

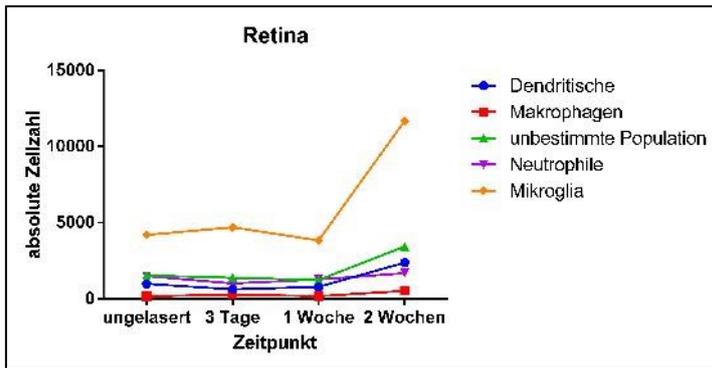


Abbildung 27: Zeitverlauf des Medians der absoluten Zellzahl einzelner Immunzellpopulationen in der Retina unter Pioglitazon- und Laserbehandlung

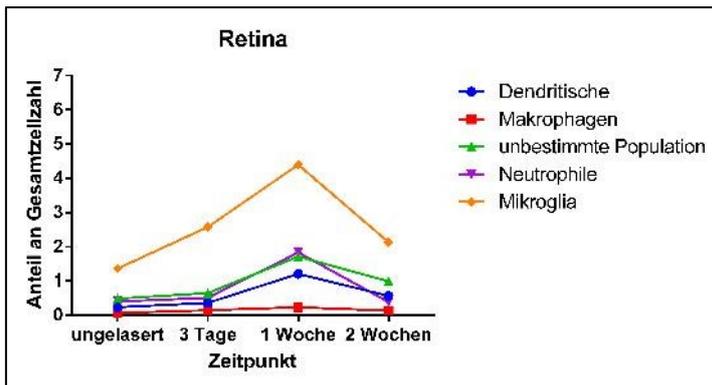


Abbildung 28: Zeitverlauf des Medians des Anteils einzelner Immunzellpopulationen an der Gesamtzellzahl in der Retina unter Pioglitazon- und Laserbehandlung [Anteil an Gesamtzellzahl in Promille]

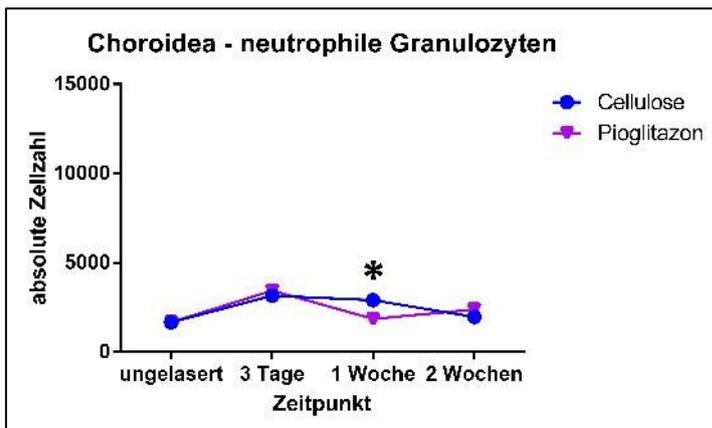


Abbildung 29: Vergleich des Zeitverlaufes des Medians der absoluten Zellzahl neutrophiler Granulozyten in der Choroidea nach Laserbehandlung unter Pioglitazon- gegenüber Cellulosebehandlung

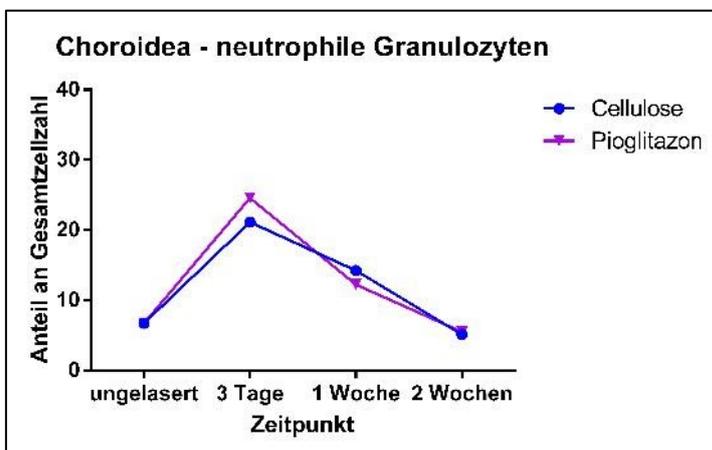


Abbildung 30: Vergleich des Zeitverlaufes des Anteils neutrophiler Granulozyten an der Gesamtzellzahl in der Choroidea nach Laserbehandlung unter Pioglitazon- gegenüber Cellulosebehandlung [Anteil an Gesamtzellzahl in Promille]

### 4.3 Ex-vivo Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Anhand der RT-PCR-Experimente wird zunächst die Veränderung der Genexpression bestimmter Zytokine als Reaktion auf eine Laserbehandlung des Augenhintergrundes gemessen. Anschließend wird der Einfluss von Pioglitazon auf die Expression dieser Zytokine gemessen. Ziel hierbei ist es, eine Aussage über Aktivierung oder Inhibierung von an immunmodulatorischen Vorgängen beteiligten Zytokinen treffen zu können.

Zusammenfassend zeigen sich drei Tage nach der Laserbehandlung signifikante Veränderungen in der Genexpression einzelner Zytokine. Insbesondere CX3CR1 und IL-1 $\beta$  weisen hier sowohl in Retina als auch in der Choroidea einen signifikanten Anstieg der Expression im Sinne einer gesteigerten Immunreaktion auf. Dieser Effekt kann zwei Wochen nach Laserbehandlung nicht mehr nachgewiesen werden.

Unter Einfluss von Pioglitazon zeigen sich sowohl Anstiege als auch Verringerungen in den Genexpressionen. Ein Einfluss von Pioglitazon auf Immunreaktionen des Auges lässt sich hiermit nachweisen. Diese Veränderungen zeigen sich vornehmlich zu dem späteren Messzeitpunkt.

#### 4.3.1 Auswirkung der Laserbehandlung

Die zunächst als Vorversuche an einzelnen ungetrennten Präparaten durchgeführten Untersuchungen zeigen zu beiden Zeitpunkten eine Tendenz zu einer vermehrten Expression von CX3CR1, IL-6, IL-1 $\beta$  und MMP-2 als Reaktion auf die Behandlung mit dem Laser (vgl. Abbildung 31 und Abbildung 32). Darüber hinaus zeigt sich nach zwei Wochen die Tendenz zu einer gesteigerten Expression von MMP-9. Auf Grund des orientierenden Charakters dieser Voruntersuchungen werden nur wenige Präparate (n=3 pro Gruppe) verwendet, was keine sinnvolle statistische Analyse erlaubt.

Bei Messungen der separaten Gewebe zeigt sich drei Tage nach der Laserbehandlung in der Retina ein signifikanter Anstieg der Expression von CX3CR1 (Faktor 2,76, p=0,007)<sup>22</sup>, IL-1 $\beta$  (Faktor 4,97, p=0,004) und MMP-2 (Faktor 1,59, p=0,038) (vgl. Abbildung 35 und Abbildung 36). In der Choroidea zeigt sich zu diesem Zeitpunkt ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Expression von CX3CR1 (Faktor 2,01, p=0,001) und IL-1 $\beta$  (Faktor 5,39, p=0,001), außerdem zeigt sich eine signifikant verringerte

---

<sup>22</sup> Der Faktor errechnet sich aus dem Quotienten der Mediane der  $\Delta 2^{Ct}$ -Werte: Der angegebene p-Wert bezieht sich auf die Signifikanzanalyse der Medianwerte anhand des Mann-Whitney-U-Testes.

Expression von TNF $\alpha$  (Faktor 0,63, p=0,026) und VEGF (Faktor 0,67, p=0,011) (vgl. Abbildung 33 und Abbildung 34). Zwei Wochen nach Laserbehandlung zeigt sich eine signifikant erhöhte Expression von MMP-9 in der Retina (Faktor 17,35, p=0,001).

### **4.3.2 Beeinflussung der Expression durch Pioglitazon**

Der Vergleich der Genexpressionen in Geweben der Kontrollgruppe und der Pioglitazon-behandelten Gruppe nach Laserbehandlung bringt wesentliche Veränderungen unter Pioglitazon-Behandlung zu Tage.

In, erneut in geringer Präparatezahl (n=3 pro Gruppe) durchgeführten, Vorversuchen an ungetrennten Geweben zeigt sich zu beiden Zeitpunkten für CX3CR1, IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MMP-2 und MMP-9 die Tendenz zu einer verringerten Genexpression unter Pioglitazon (vgl. Abbildung 31 und Abbildung 32). Die Expression von IL-10 zeigt drei Tage nach Laser zunächst eine verminderte, zwei Wochen nach Laserbehandlung eine verstärkte Expression.

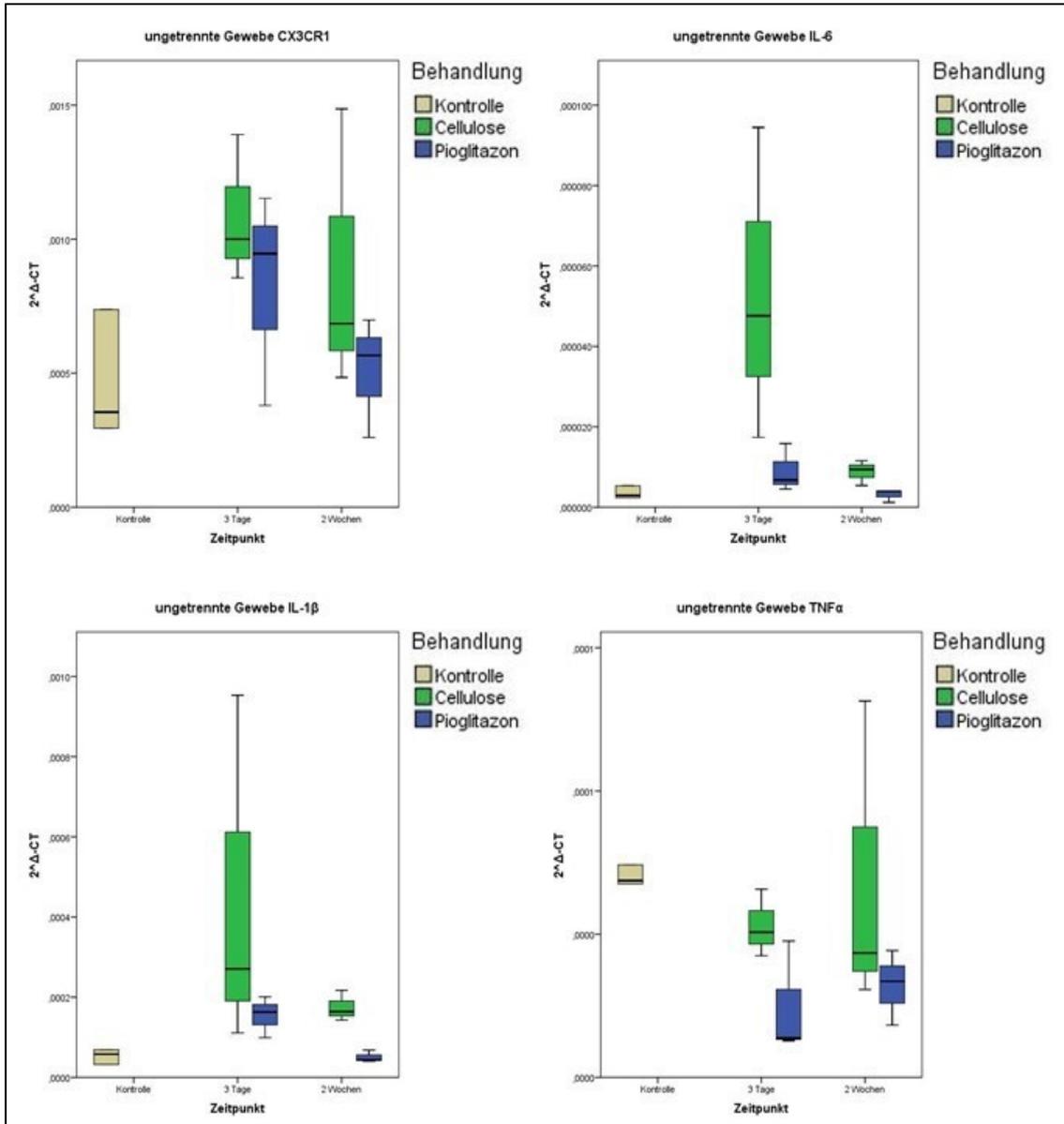


Abbildung 31: Darstellung der  $2^{\Delta\Delta CT}$ -Werte der Voruntersuchungen an ungetrennten Gewebeproben von CX3CR1, IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ <sup>23</sup> [von links oben nach rechts unten]

<sup>23</sup> geringe Probenzahlen, keine Prüfung auf Signifikanz möglich

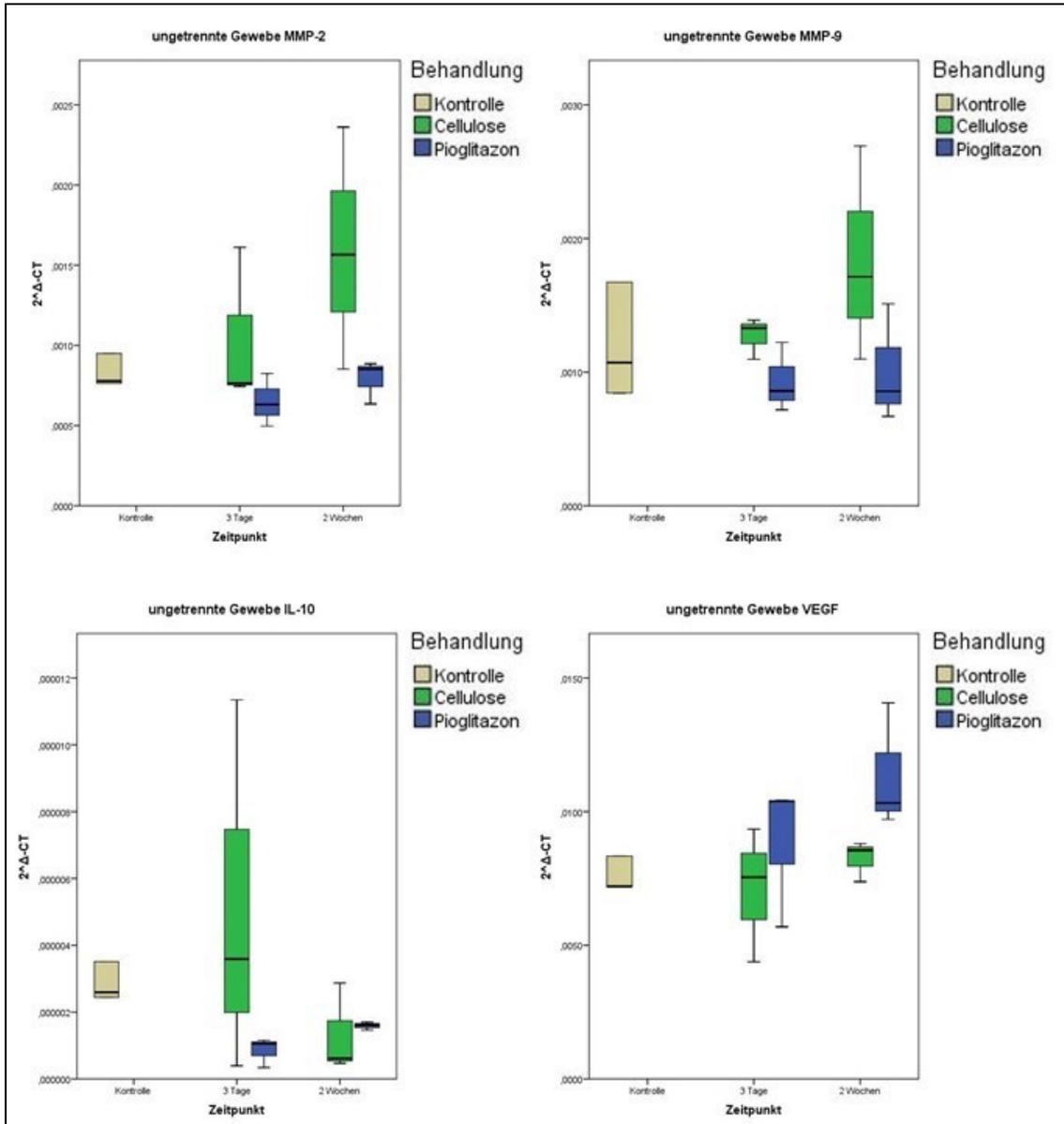


Abbildung 32: Darstellung der  $2^{\Delta\Delta CT}$ -Werte der Voruntersuchungen an ungetrennten Gewebeproben von MMP-2, MMP-9, IL-10 und VEGF<sup>24</sup> [von links oben nach rechts unten]

In der separat präparierten Choroidea findet sich drei Tage nach Laser eine signifikant verringerte Genexpression für IL-1 $\beta$  (Faktor 0,47,  $p=0,038$ )<sup>25</sup> unter Einfluss von Pioglitazon.

<sup>24</sup> geringe Probenzahlen, keine Prüfung auf Signifikanz möglich

<sup>25</sup> Der Faktor errechnet sich aus dem Quotienten der Mediane der  $\Delta\Delta CT$ -Werte: Der angegebene p-Wert bezieht sich auf die Signifikanzanalyse der Medianwerte anhand des Mann-Whitney-U-Testes.

Nach 2 Wochen zeigt sich unter Pioglitazon eine signifikant erhöhte Genexpression für CX3CR1 (Faktor 2,62,  $p=0,001$ ), TNF $\alpha$  (Faktor 2,31,  $p=0,017$ ), IL-10 (Faktor 2,62,  $p=0,02$ ) und MMP-2 (Faktor 2,08,  $p=0,014$ ) in der Choroidea. Darüber hinaus findet sich eine signifikant verringerte Expression von MMP-9 (Faktor 0,36,  $p=0,001$ ) (vgl. Abbildung 33 und Abbildung 34).

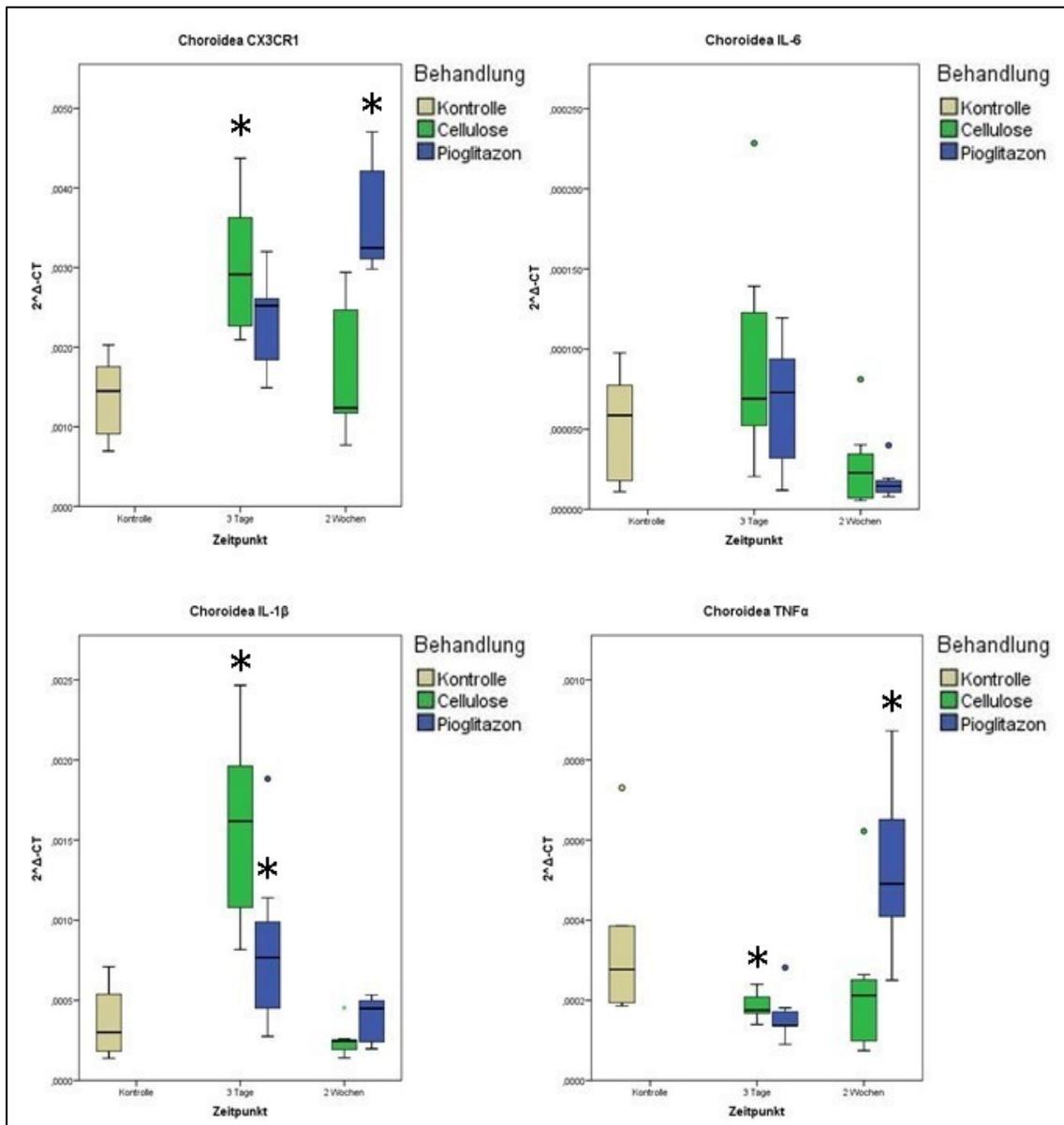


Abbildung 33: Darstellung der Genexpression von CX3CR1, IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  in choroidalem Gewebe<sup>26</sup> [von links oben nach rechts unten]

<sup>26</sup> Signifikanz von Cellulose bezieht sich auf Kontrolle, Signifikanz von Pioglitazon bezieht sich auf Cellulose

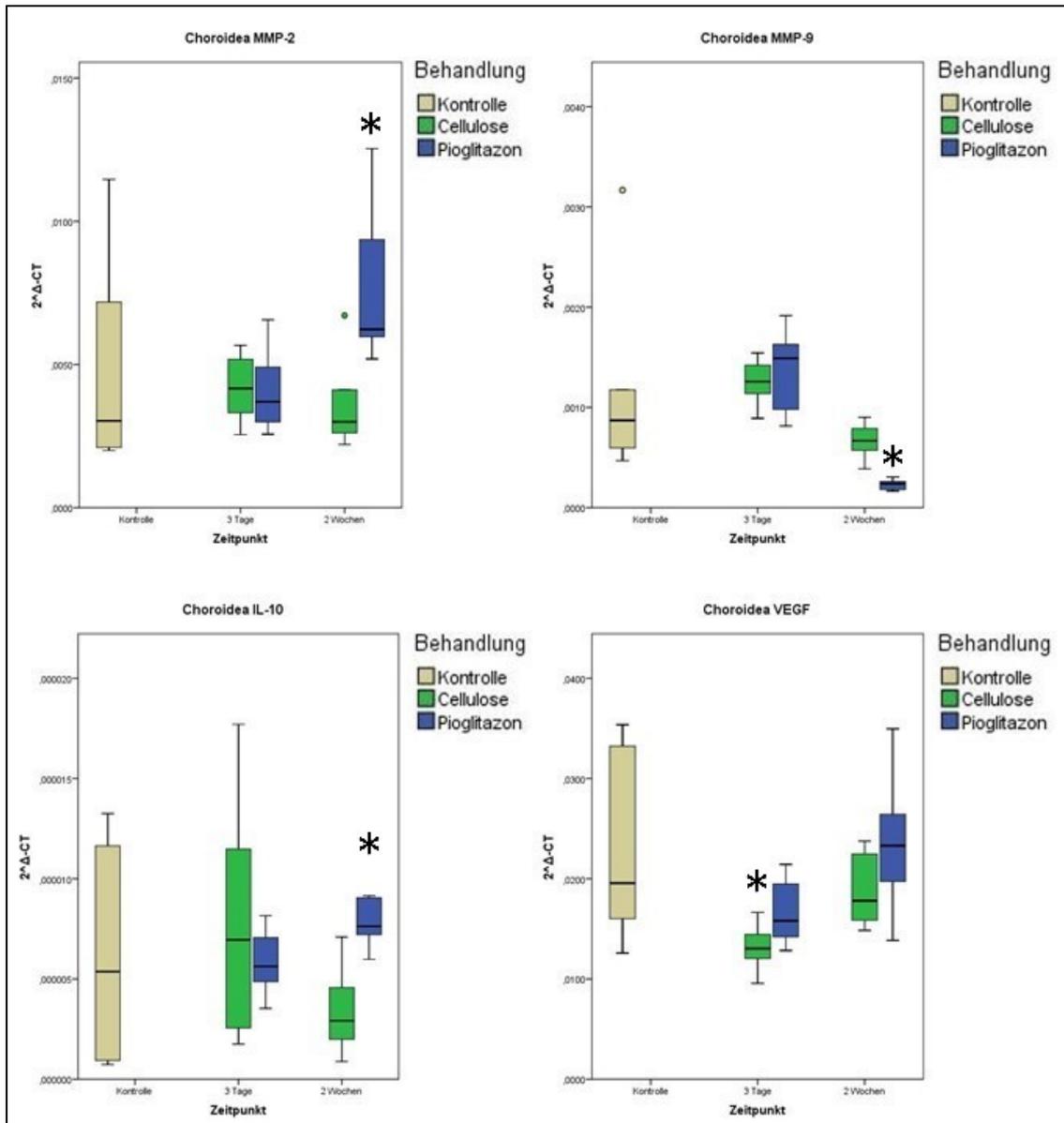


Abbildung 34: Darstellung der Genexpression von MMP-2, MMP-9, IL-10 und VEGF in choroidalem Gewebe<sup>27</sup> [von links oben nach rechts unten]

In der Retina zeigt sich 3 Tage nach Laserbehandlung eine signifikant verringerte Expression für TNF $\alpha$  (Faktor 0,57;  $p=0,007$ ) unter Pioglitazon.

Nach zwei Wochen findet sich eine signifikante Verringerung der Genexpression von MMP-9. Durch diese Herabregulierung zeigt sich die Expression von MMP-9 wieder ähnlich der Expression in den Kontrollproben. Gegenüber der Cellulosegruppe zeigt sich eine Verringerung um den Faktor 0,04 ( $p=0,001$ ) (vgl. Abbildung 35 und Abbildung 36).

<sup>27</sup> Signifikanz von Cellulose bezieht sich auf Kontrolle, Signifikanz von Pioglitazon bezieht sich auf Cellulose

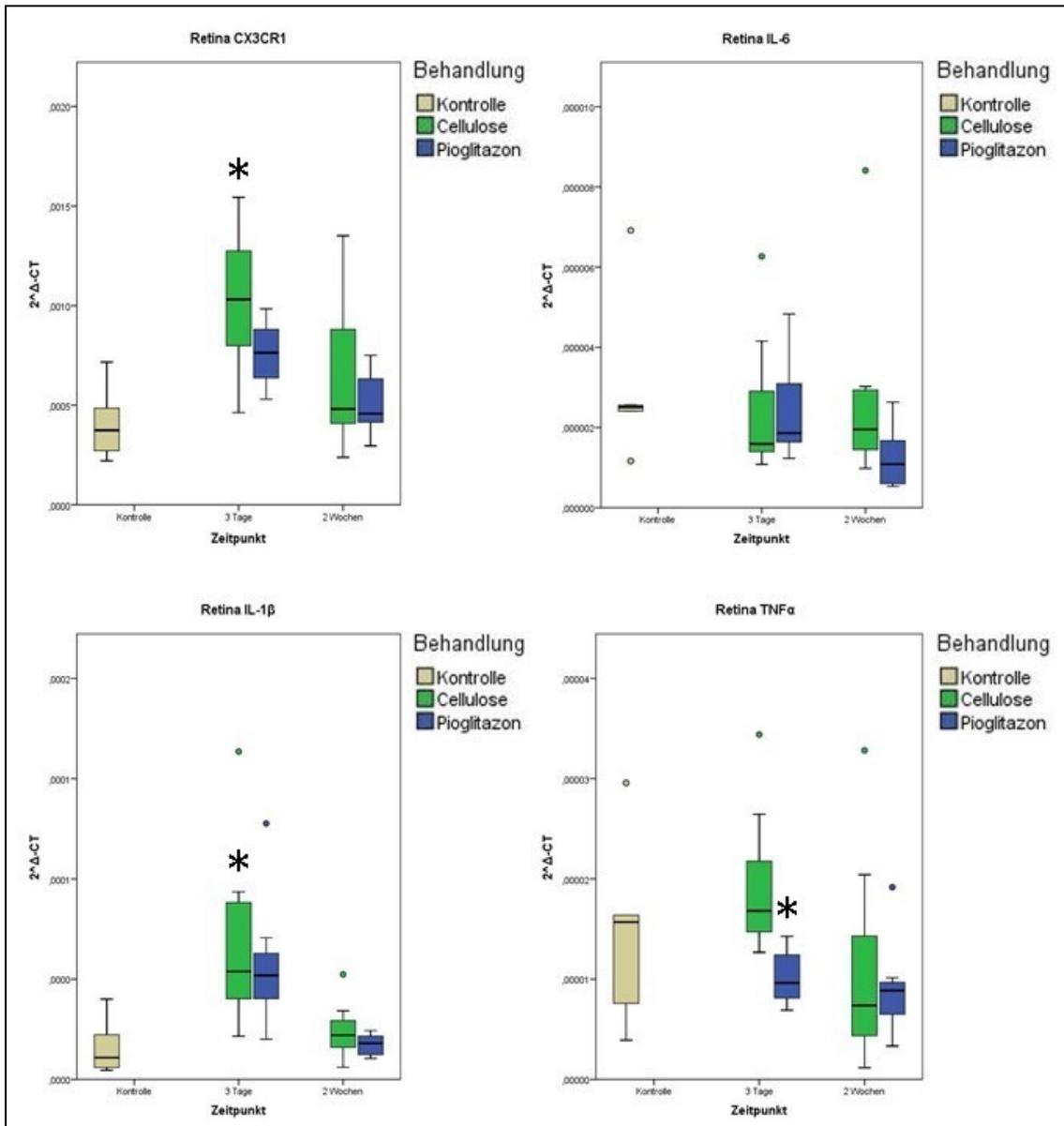


Abbildung 35: Darstellung der Genexpression von CX3CR1, IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  in retinalem Gewebe<sup>28</sup> [von links oben nach rechts unten]

<sup>28</sup> Signifikanz von Cellulose bezieht sich auf Kontrolle, Signifikanz von Pioglitazon bezieht sich auf Cellulose

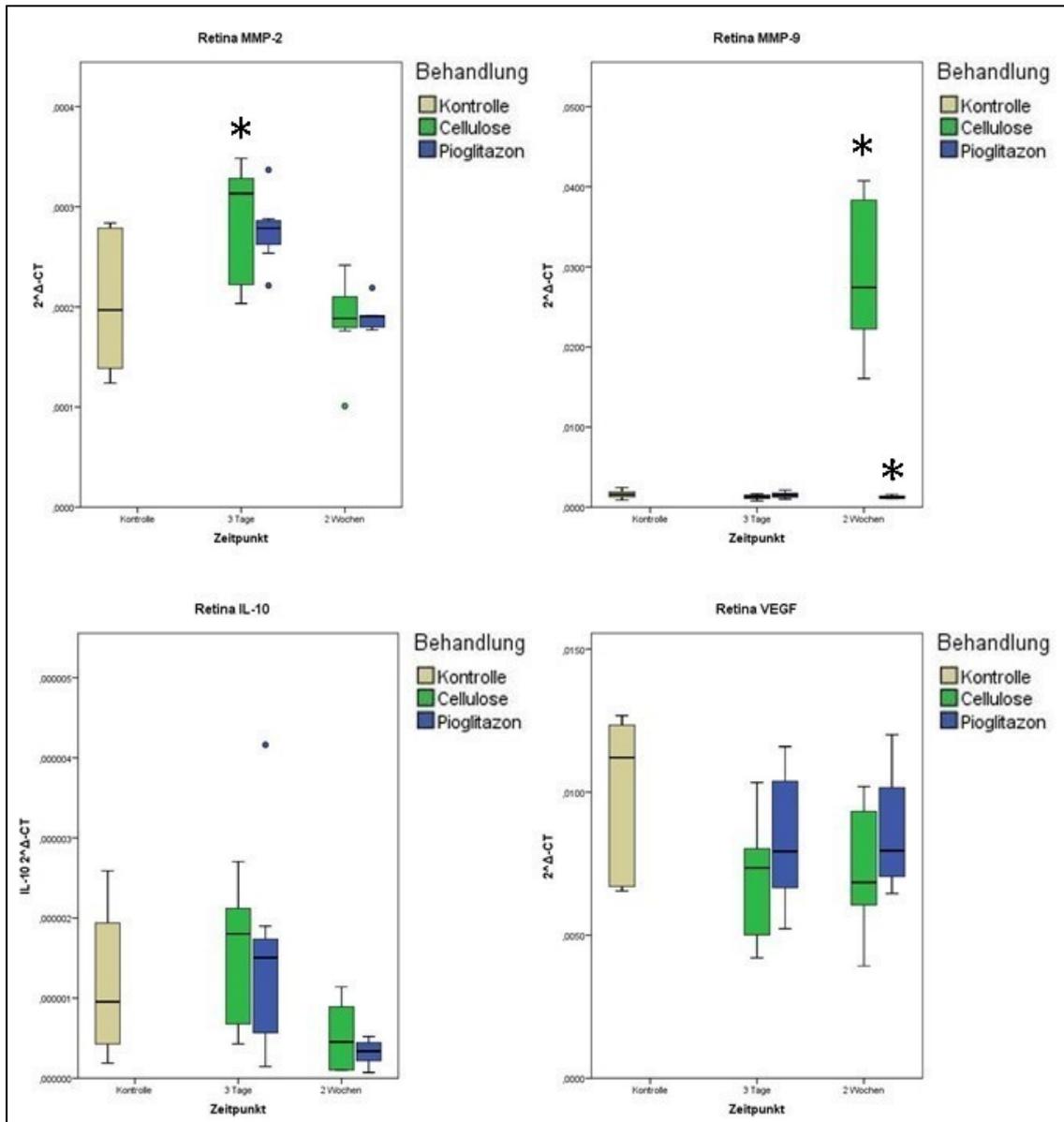


Abbildung 36: Darstellung der Genexpression von MMP-2, MMP-9, IL-10 und VEGF in retinalem Gewebe<sup>29</sup> [von links oben nach rechts unten]

In Tabelle 5 und Tabelle 6 ist ein Überblick zu den signifikanten Veränderungen, welche sich im Rahmen der RT-PCR gezeigt haben, dargestellt.

<sup>29</sup> Signifikanz von Cellulose bezieht sich auf Kontrolle, Signifikanz von Pioglitazon bezieht sich auf Cellulose

Einfluss der Laserbehandlung	Retina	Choroidea
3 Tage nach Laser	CX3CR1 ↑	CX3CR1 ↑
	IL-6 ↔	IL-6 ↔
	IL-1β ↑	IL-1β ↑
	TNFα ↔	TNFα ↓
	MMP-2 ↑	MMP-2 ↓
	MMP-9 ↔	MMP-9 ↔
	IL-10 ↔	IL-10 ↔
	VEGF ↔	VEGF ↔
2 Wochen nach Laser	CX3CR1 ↔	CX3CR1 ↔
	IL-6 ↔	IL-6 ↔
	IL-1β ↔	IL-1β ↔
	TNFα ↔	TNFα ↔
	MMP-2 ↔	MMP-2 ↔
	MMP-9 ↑	MMP-9 ↔
	IL-10 ↔	IL-10 ↔
	VEGF ↔	VEGF ↔

↔ Keine signifikante Veränderung  
 ↑ signifikante Hochregulation  
 ↓ signifikante Herabregulation

**Tabelle 5: Gesamtübersicht der Wirkung der Laserbehandlung an murinen Augen auf die Zytokinregulation von Retina und Choroidea**

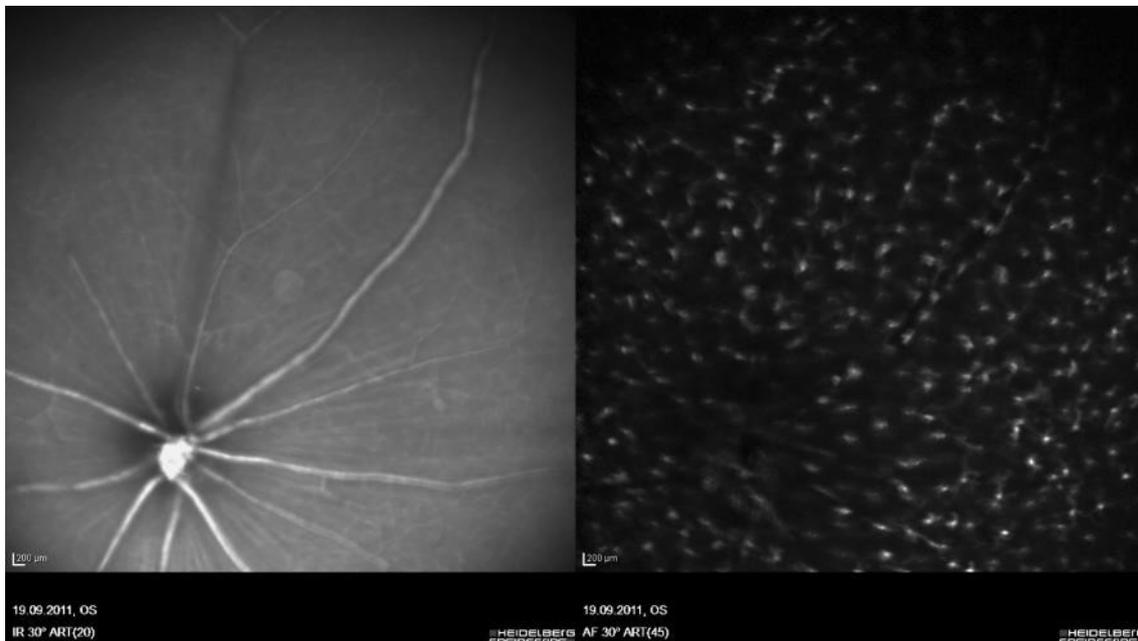
Einfluss von Pioglitazon	Retina	Choroidea
3 Tage nach Laser	CX3CR1 ↔	CX3CR1 ↔
	IL-6 ↔	IL-6 ↔
	IL-1β ↔	IL-1β ↓
	TNFα ↓	TNFα ↔
	MMP-2 ↔	MMP-2 ↔
	MMP-9 ↔	MMP-9 ↔
	IL-10 ↔	IL-10 ↔
	VEGF ↔	VEGF ↔
2 Wochen nach Laser	CX3CR1 ↔	CX3CR1 ↑
	IL-6 ↔	IL-6 ↔
	IL-1β ↔	IL-1β ↔
	TNFα ↔	TNFα ↑
	MMP-2 ↔	MMP-2 ↑
	MMP-9 ↓	MMP-9 ↓
	IL-10 ↔	IL-10 ↑
	VEGF ↔	VEGF ↔

↔ Keine signifikante Veränderung  
 ↑ signifikante Hochregulation  
 ↓ signifikante Herabregulation

**Tabelle 6: Gesamtübersicht der Wirkung von Pioglitazon an gelaserten murinen Augen auf die Zytokinregulation von Retina und Choroidea**

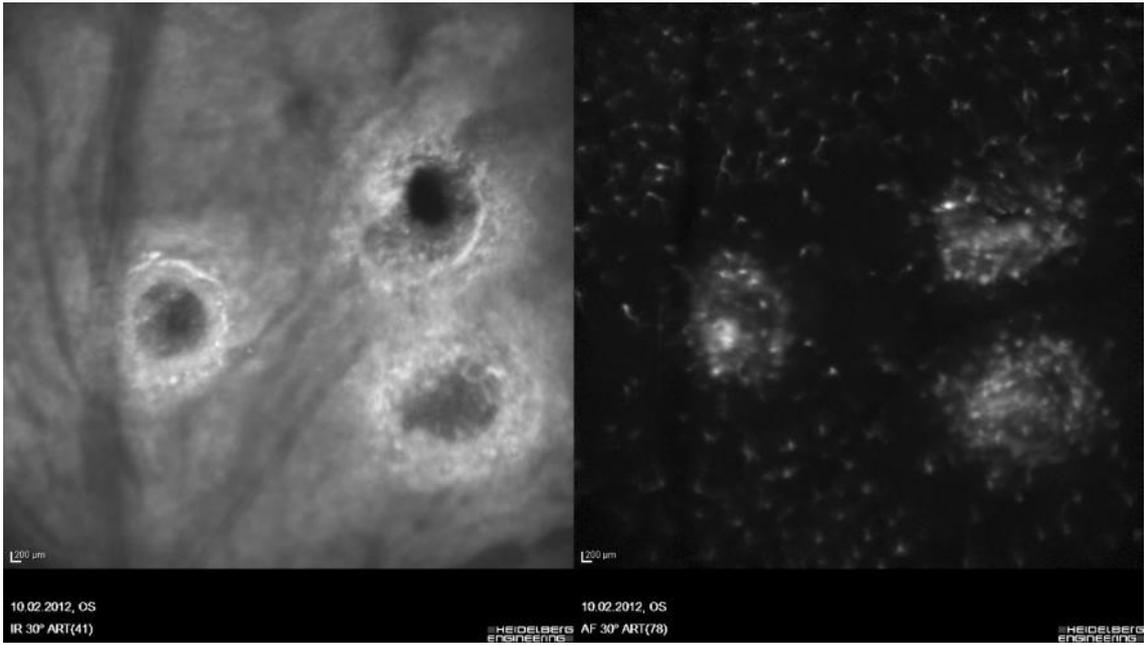
## 4.4 In-vivo Autofluoreszenzuntersuchungen

Ziel der Autofluoreszenzuntersuchungen ist es, den Einfluss von Pioglitazon auf die Migration von CX3CR1-positiven Zellen in-vivo zu untersuchen und zu quantifizieren. Wie bereits dargelegt sehen wir die CX3CR1-positiven Zellen der Retina als Mikrogliazellen an. Wir gehen davon aus, dass die Pioglitazonbehandlung in einer verringerten Migration der Mikrogliazellen der Retina resultiert. In Abbildung 37 ist der Augenhintergrund einer unbehandelten Maus dargestellt, bei welcher keine Zellmigrationen durch Laserbehandlung induziert wurden. Abbildung 38 zeigt exemplarisch den Augenhintergrund einer gelaserten und Cellulose-gefütterten, Abbildung 39 den einer gelaserten und Pioglitazon-gefütterten Maus.

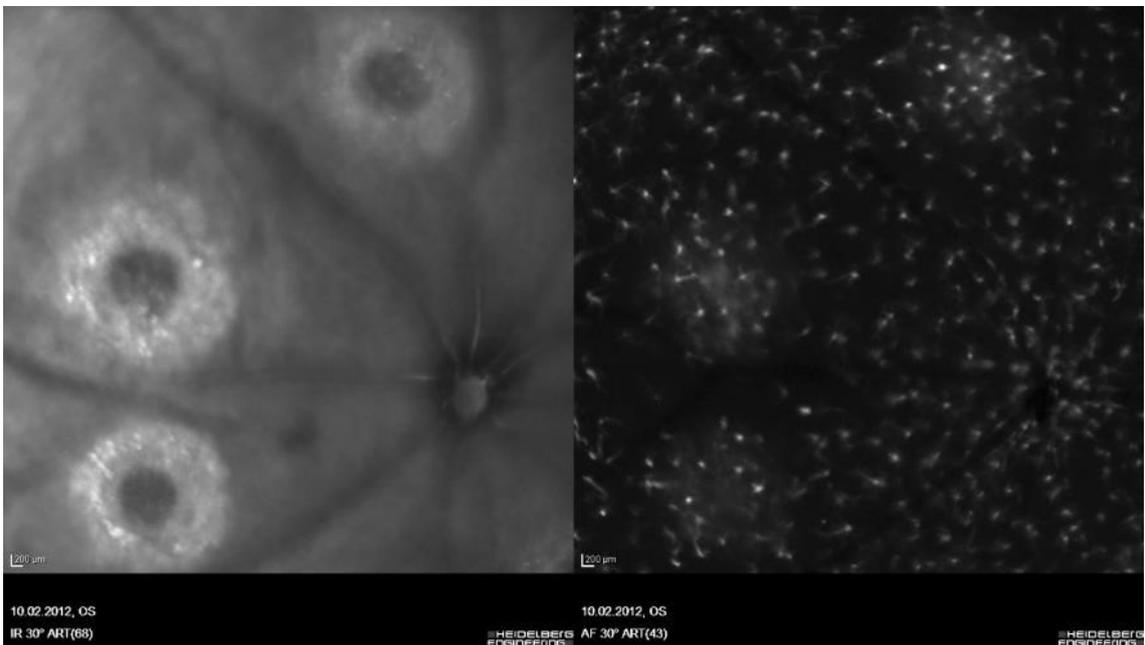


**Abbildung 37: Nativaufnahme (links) und Autofluoreszenzaufnahme (rechts) eines unbehandelten Augenhintergrundes einer CX3CR1-knock-in Maus**

Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass Pioglitazon zu einer verringerten Migration von Mikrogliazellen führt. Dieser Effekt ist insbesondere zu den frühen Zeitpunkten signifikant. Zwei Wochen nach Laserbehandlung lässt sich kein signifikanter Unterschied mehr feststellen.



**Abbildung 38: Nativaufnahme (links) und Autofluoreszenzaufnahme (rechts) eines gelaserten Augenhintergrundes einer Cellulose-gefütterten CX3CR1-knock-in Maus (3 Tage nach Laser)**



**Abbildung 39: Nativaufnahme (links) und Autofluoreszenzaufnahme (rechts) eines gelaserten Augenhintergrundes einer Pioglitazon-gefütterten CX3CR1-knock-in Maus (3 Tage nach Laser)**

Drei Tage nach Laser findet sich bei Pioglitazon-behandelten Tieren im Vergleich zu Cellulose-gefütterten Tieren ein signifikant verringerter Intensitätsquotient (Faktor 0,64;  $p < 0,000$ )<sup>30</sup> im Sinne einer verminderten Mikroglia-Migration. Dies zeigt sich auch an einer Tendenz zu einer geringeren GFP-Intensität in den Laserherden (Faktor 0,88;  $p = 0,084$ ) und einer signifikant höheren GFP-Intensität in der Laserherd-Peripherie der Pioglitazongruppe (Faktor 1,33;  $p < 0,000$ ) (vgl. Abbildung 40).

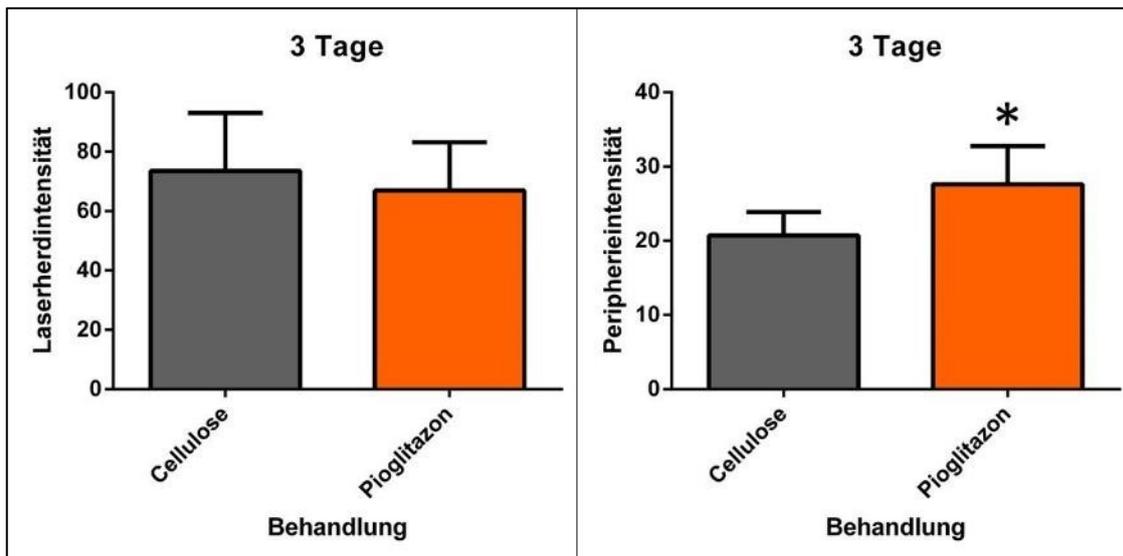


Abbildung 40: Laserherdintensität (links) und Peripherieintensität (rechts) 3 Tage nach Laserbehandlung

Auch nach einer Woche zeigt sich eine verminderte Mikroglia-Migration anhand des signifikant erhöhten Intensitätsquotienten (Faktor 0,74;  $p = 0,010$ ) in der Pioglitazongruppe (vgl. Abbildung 41). Dies ergibt sich aus einer leichten, nicht signifikanten Intensitätsminderung in der Laserherdperipherie (Faktor 0,87;  $p = 0,266$ ), sowie einer signifikant höheren GFP-Intensität in den Laserherden (Faktor 0,75;  $p = 0,033$ ),

Zwei Wochen nach Laser können keine signifikanten Unterschiede in der Anordnung der Mikrogliazellen der Pioglitazon-behandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe mehr festgestellt werden. Die Veränderung des Intensitätsquotienten zeigt mit einem Faktor von 0,93 ( $p = 0,328$ ) keinen signifikanten Unterschied (vgl. Abbildung 42).

<sup>30</sup> Der Faktor errechnet sich aus dem Quotienten der Mediane der *Intensitätsquotienten* (beziehungsweise im Folgenden auch der *Laserherdintensitäten* und *Peripherieintensitäten*): Der angegebene p-Wert bezieht sich auf die Signifikanzanalyse der Medianwerte anhand des Mann-Whitney-U-Testes.

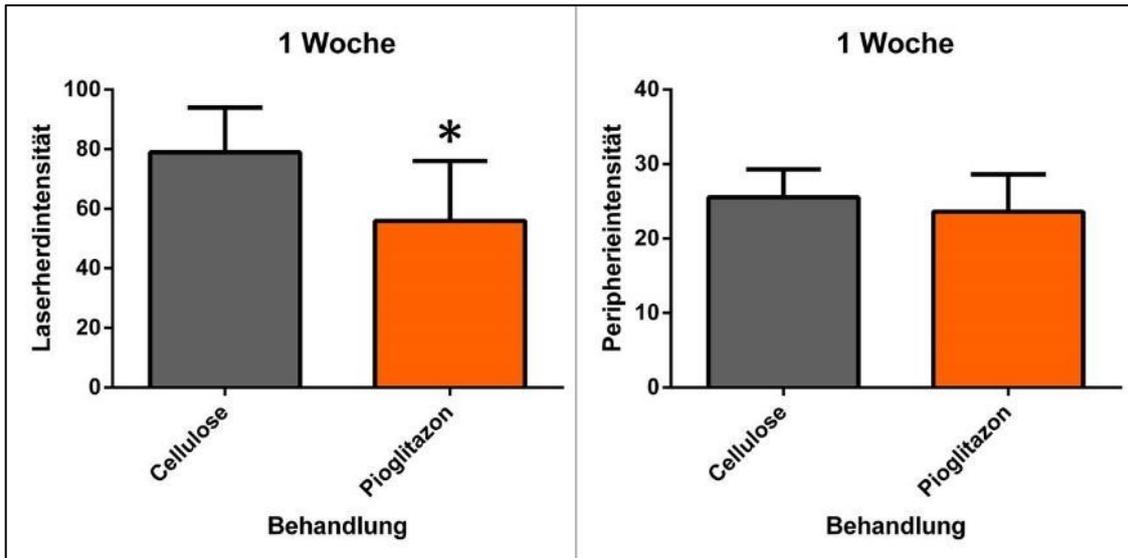


Abbildung 41: Laserherdintensität (links) und Peripherieintensität (rechts) eine Woche nach Laserbehandlung

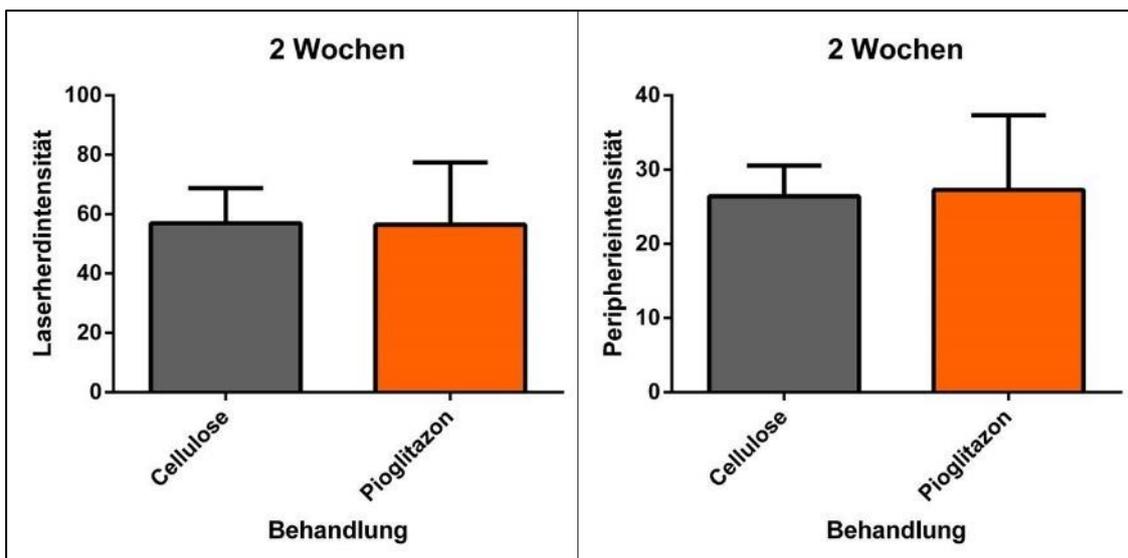


Abbildung 42: Laserherdintensität (links) und Peripherieintensität (rechts) zwei Wochen nach Laserbehandlung

Der Intensitätsquotient beider Gruppen nimmt über alle drei Zeitpunkte kontinuierlich ab (vgl. Abbildung 43, Abbildung 44 und Abbildung 45). Die Pioglitazon-Gruppe weist jedoch von vornherein einen deutlich niedrigeren Intensitätsquotienten, welcher sich infolge dessen auch nicht in dem gleichen Maße wie der Kontrollgruppen-Intensitätsquotient verändert. Dieser gleicht sich dem Wert der Pioglitazon-Gruppe nach zwei Wochen an, somit zeigen sich zwei Wochen nach Laserbehandlung kaum noch Veränderungen in der Zellmigration und Zellverteilung zwischen den beobachteten Gruppen.

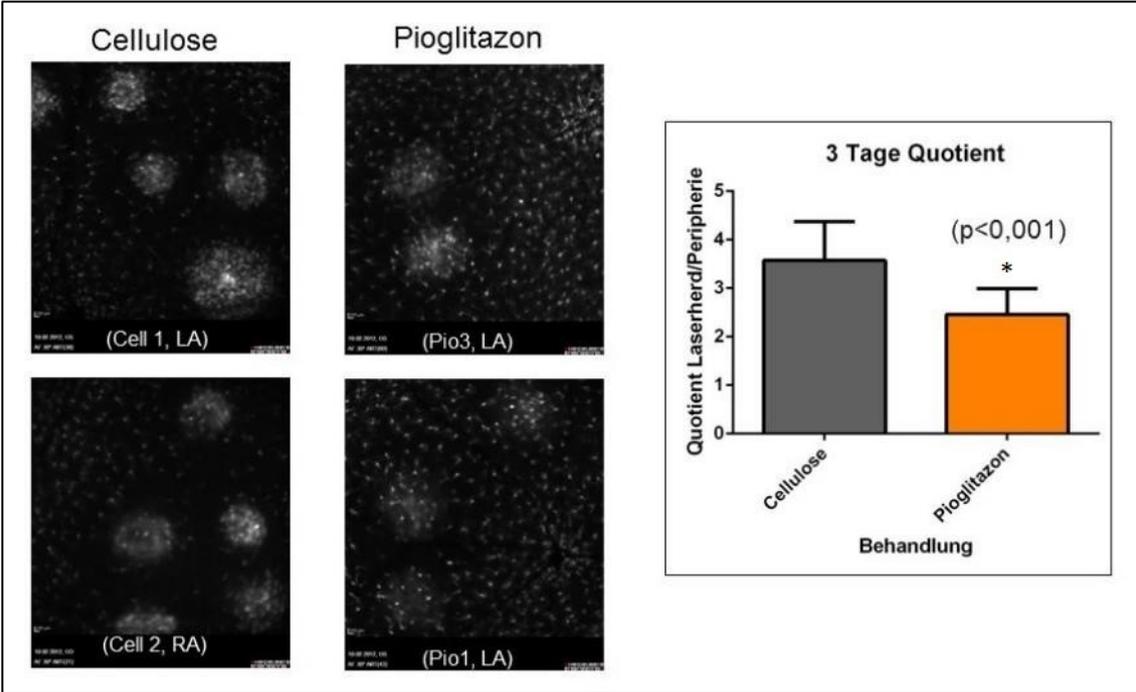


Abbildung 43: Autofluoreszenzaufnahmen Cellulosegruppe (links) und Pioglitazongruppe (rechts), sowie Intensitätsquotient 3 Tage nach Laserbehandlung

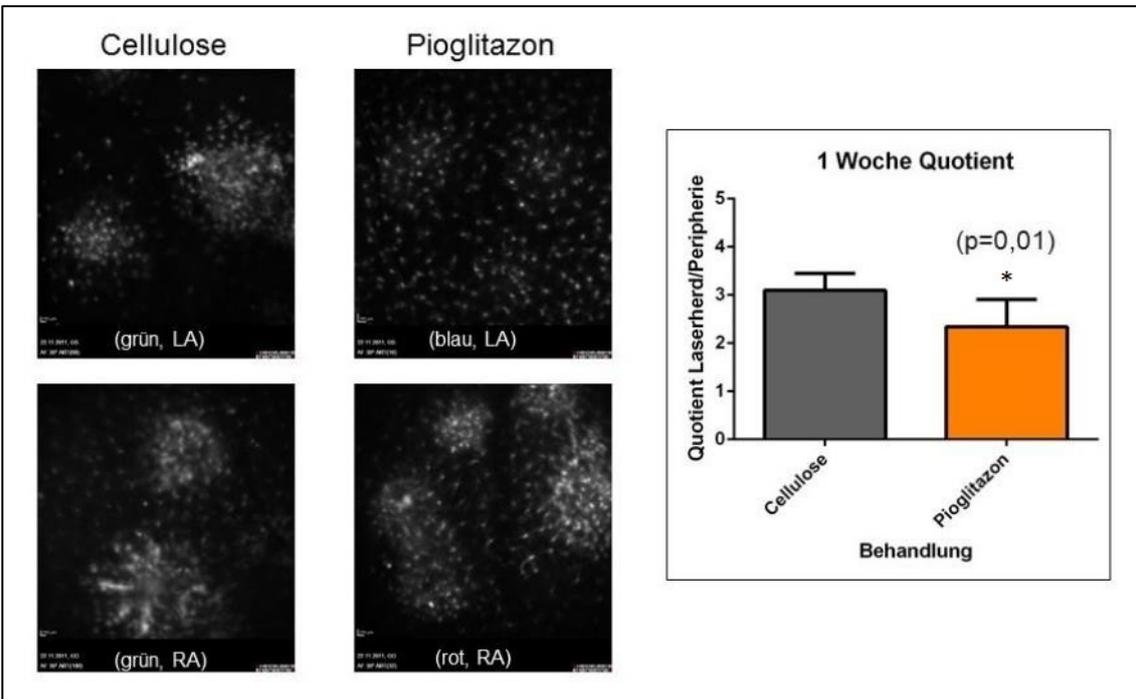


Abbildung 44: Autofluoreszenzaufnahmen Cellulosegruppe (links) und Pioglitazongruppe (rechts), sowie Intensitätsquotient eine Woche nach Laserbehandlung

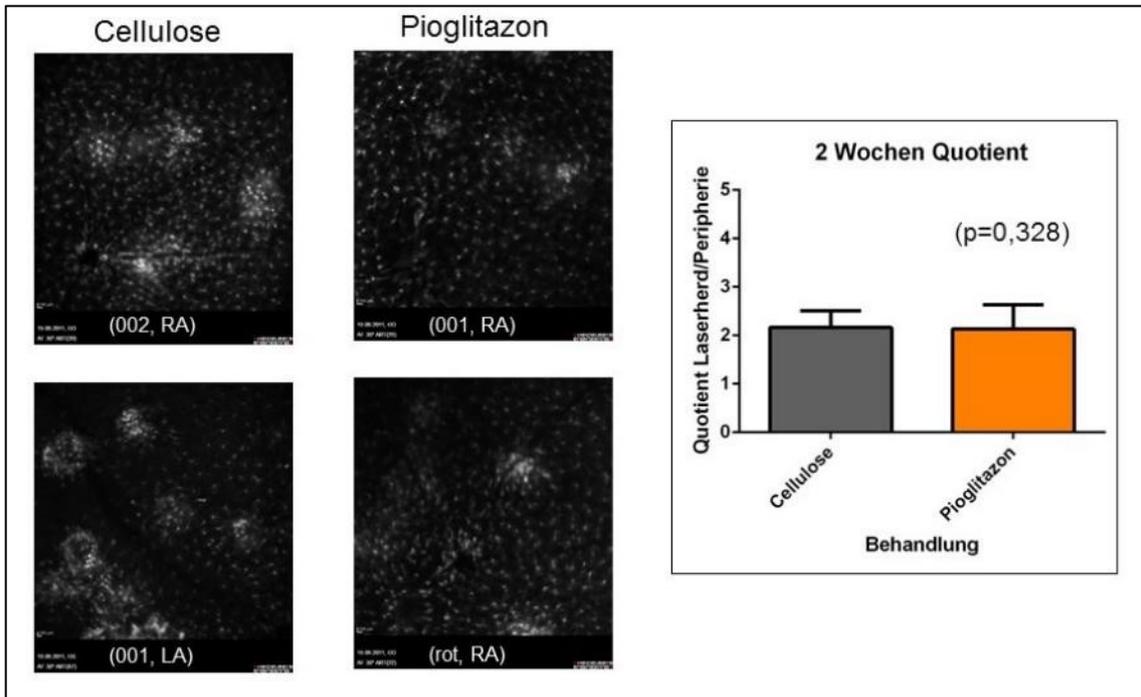


Abbildung 45: Autofluoreszenzaufnahmen Cellulosegruppe (links) und Pioglitazongruppe (rechts), sowie Intensitätsquotient zwei Wochen nach Laserbehandlung

## 5 Diskussion

### 5.1 Interpretation der Ergebnisse

#### Überblick

Für den Wirkstoff Pioglitazon konnten in diversen Studien Hinweise auf immunmodulatorische Wirkungen an einem weiten Spektrum an Geweben gefunden werden. So unterstützt Pioglitazon die Aufrechterhaltung eines antiinflammatorischen Status in viszeralem Fettgewebe in einem Mausmodell der Sepsis [70]. Auch wird die Ethanol-induzierte Immunreaktion und Aktivierung von Mikrogliazellen in Cerebellum, zerebralem Kortex und Hippocampus in einem Mausmodell des fetalen Alkoholsyndroms reduziert, sowie Neuroinflammation im Mesencephalon und Striatum in einem Mausmodell der Parkinson-Krankheit beeinflusst [32, 105]. Für das Auge konnte gezeigt werden, dass Pioglitazon die im experimentellen Rahmen induzierte Autoimmun-Uveitis in Mäusen reduziert [99].

In dieser Arbeit konnte mit der Untersuchung von Retina und Choroidea im Rahmen des laserinduzierten CNV-Modells der Einfluss von Pioglitazon auf weitere Gewebe nachgewiesen werden.

#### Autofluoreszenz

Der signifikant verringerte Intensitätsquotient in der Autofluoreszenz drei Tage nach Laserbehandlung erlaubt den Rückschluss auf eine signifikant verringerte Migration der für das Immunsystem des Auges zentralen Mikrogliazellen unter Einfluss von Pioglitazon als Reaktion auf einen akuten Reiz. Dieser Einfluss kann auch noch eine Woche nach Laserbehandlung gezeigt werden. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die Mikroglia migration durch Pioglitazon bereits von Beginn an, also ab dem Zeitpunkt des Setzens des Entzündungsreizes, inhibiert wird. Der im zeitlichen Verlauf annähernd gleichbleibende Intensitätsquotient in der Pioglitazon-Gruppe zeigt eine kontinuierliche Inhibierung der Migration der Mikrogliazellen über alle beobachteten Zeitpunkte. Dies passt zu Beobachtungen von Drew et al, welche nachweisen konnten, dass Pioglitazon die ethanolinduzierte Mikrogliaaktivierung in Hippocampus, Cerebellum und Cerebrum eines Maus-Modells des fetalen Alkoholsyndroms inhibiert [32]. In der Literatur finden sich viele Hinweise darauf, dass aktivierte und migrierte Mikrogliazellen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der AMD einnehmen [84, 114]. So zeigten insbesondere Ma et al einen direkten Einfluss von Mikrogliazellen auf die Ausbildung von CNV [84]. Sollte sich im Rahmen weiterer Studien, einhergehend mit der nun nachgewiesenen verminderten Mikroglia migration, eine signifikante Reduktion der CNV nachweisen

lassen, würde dies einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung der AMD mit einem bereits etablierten Medikament darstellen. Eine weitergehende Studie mit Fokus auf die Ausdehnung von CNV-Membranen könnte hierzu weitere Erkenntnisse liefern.

### **Durchflusszytometrie in-vitro**

In der Durchflusszytometrie finden sich keine signifikanten Veränderungen in Bezug auf die Zellproliferation oder auf die Anzahl toter Zellen als Antwort auf die Zugabe von Pioglitazon. Ein Einfluss von Pioglitazon auf die Endothelzellzahl, zumindest bei Fehlen von zusätzlichen Stressfaktoren, erscheint somit unwahrscheinlich. Denkbar wären jedoch langfristige indirekte Wirkungen, beispielsweise über veränderte Zytokinexpressionen oder Wachstumsfaktoren. Ein interessanter Ansatz zur Untersuchung des Einflusses von Pioglitazon wäre die Beobachtung unter zusätzlichem Zellstress, beispielsweise durch Zugabe von zelltoxischen Substanzen oder Zellkultur unter hypoxischen Bedingungen.

### **Durchflusszytometrie ex-vivo**

Anhand der von Eter et al. vorgestellten Methode zur Differenzierung von Immunzellen konnte eine Einordnung der gemessenen Zellen erfolgen [37]. Für Zellen, welche die Oberflächenmarker CX3CR1 und CD11b aufweisen, muss ergänzend eine auf rationalen Überlegungen basierende Einordnung erfolgen, da sowohl Monozyten des Blutes als auch Mikrogliazellen diese Marker aufweisen. Für Proben ohne Kenntnis des Ursprungsgewebes ist mit unseren Methoden keine genaue Unterscheidung zwischen Mikrogliazellen und Monozyten möglich. Da sich Mikrogliazellen, als Bestandteil der Neuroretina, im gesunden Auge nicht in der Choroidea finden [29], bezeichnen wir die Zellen mit den besprochenen Oberflächenmarkern in der Choroidea als Monozyten. Sollten auf Grund von Schäden der Blut-Retina-Schranke oder auf Grund der Präparation Mikrogliazellen in das Präparat der Choroidea gelangen, ist eine klare Abgrenzung im weiteren Verlauf nicht möglich. Für die Retina konnten Combadière et al. nachweisen, dass Mikrogliazellen die einzigen CX3CR1-exprimierenden Zellen sind, weshalb wir in den durchflusszytometrischen Untersuchungen alle CX3CR1-positiven Zellen der Retina als Mikrogliazellen bezeichnen [29].

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen können, abgesehen von einer zu einem einzelnen Zeitpunkt verringerten Anzahl neutrophiler Granulozyten, keinen signifikanten Einfluss von Pioglitazon auf die Anzahl der am Augenhintergrund vorhandenen Zellen nachweisen. Es kann somit festgestellt werden, dass Pioglitazon keinen Einfluss auf eine

Produktion oder Rekrutierung von Mikrogliazellen aus einem anderen als den beobachteten Geweben zu haben scheint.

Trotz der fehlenden Wirkung von Pioglitazon auf die Anzahl der gemessenen einzelnen Immunzellen zeigt sich dennoch ein interessanter Umstand in der durchflusszytometrischen Untersuchung der absoluten Immunzellzahlen sowohl von Retina als auch von Choroidea. In beiden Geweben zeigt sich nach zwei Wochen, unabhängig von der Pioglitazonbehandlung, ein statistisch signifikanter Anstieg der gesamten Immunzellzahl. In der Retina scheint dieser Anstieg durch Zellen bedingt zu sein, welche von den Markern her den Mikrogliazellen oder Makrophagen zuzuordnen sind, in der Choroidea handelt es sich um die „unbestimmte Population“. In der Retina ist eine im Rahmen von Umbauprozessen verzögerte Schädigung der Blut-Retina-Schranke und somit unkontrolliertere Ansammlung weiterer Zellen denkbar, dies würde auch die Beobachtung erklären, dass zwar einerseits die absolute Immunzellzahl signifikant angestiegen ist, der Anteil der Immunzellen an der Gesamtzellzahl sich jedoch wieder normalisiert, also auch von einem Anstieg von nicht-Immunzellen auszugehen ist. Das Einwandern von nicht-Immunzellen liefert auch eine Erklärung für den, in der Choroidea nach zwei Wochen im Vergleich zu dem vorherigen Zeitpunkt beobachteten, rückläufigen Anteil der Immunzellen an der Gesamtzellzahl. Eine Erklärung für den Anstieg der absoluten Immunzellzahl in der Choroidea liefert dies jedoch nicht. Dies ist insofern interessant, als dass sich hier vermehrt Zellen mit für Immunzellen typischen Oberflächenmarkern ansammeln, welche in den bisherigen Untersuchungen keine weitere Betrachtung gefunden haben. Untersuchungen mit weiteren Oberflächenmarkern könnten hier gegebenenfalls eine genauere Differenzierung ermöglichen.

### **RT-PCR ex-vivo**

Die signifikant verringerte Expression von MMP-9 unter Pioglitazoneinfluss in der RT-PCR zwei Wochen nach Laserbehandlung sowohl in Choroidea als auch in der Retina bietet einen interessanten Ansatz für die Erklärung einer möglicherweise langfristigen Beeinflussung der im Rahmen der AMD auftretenden strukturellen Veränderungen durch Pioglitazon. Die im Rahmen der Kontrolle des verwendeten Modells festgestellte signifikante Hochregulierung der Genexpression von MMP-9 passt zu den Beobachtungen von Chau et al., in welchen ein erhöhtes Plasmalevel von MMP-9 bei Patienten mit AMD festgestellt wurde [23].

Der nach 14 Tagen auftretende, signifikante Einfluss der Pioglitazonbehandlung auf die Expression von MMP-9 sowohl in Retina als auch in Choroidea deckt sich mit Untersuchungen von Chang et al. [22], welche in einem murinen Modell der carotiden Arteriosklerose ebenfalls eine signifikante Reduktion der Expression von MMP-9 unter Behandlung mit Pioglitazon feststellen konnten. Dies wirft die Frage nach den tatsächlichen Plasmalevels von MMP-9 zu den früheren Beobachtungszeitpunkten auf. Ein Nachweis veränderter Plasmalevels bereits drei Tage und eine Woche nach Laserbehandlung könnte die Verbindung und Erklärung für die im Rahmen der Autofluoreszenz nachgewiesene verringerte Zellmigration von Mikrogliazellen unter Pioglitazonbehandlung liefern.

Auch die weiteren Ergebnisse der Real-Time-PCR bieten interessante Ansätze zur weiteren Beleuchtung der Pathogenese der AMD.

So unterstützen die, drei Tage nach Laserbehandlung gefundenen, signifikant verringerten Genexpressionen von IL-1 $\beta$  in der Choroidea und TNF $\alpha$  in der Retina die Hypothese, dass Pioglitazon einen hemmenden Einfluss auf Entzündungsvorgänge des Augenhintergrundes hat. Auch die zwei Wochen nach Laserbehandlung verstärkte Genexpression von IL-10 in der Choroidea spricht für diese These. Diese Beobachtung einer verminderten Expression proinflammatorischer Zytokine sowie verstärkten Expression antiinflammatorischer Zytokine unter Pioglitazoneinfluss passt zu Untersuchungen an anderen Geweben und Zellen, im Rahmen derer ebenfalls signifikante Veränderungen in der Zytokinexpression unter Pioglitazoneinfluss festgestellt werden konnten. So reagierten lipopolysaccharid-stimulierte Astrozyten unter Pioglitazoneinfluss mit einer Verringerung der Level von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6, sowie einer Erhöhung des Levels von IL-10 [108]. In einem Modell der autoimmunen Uveitis zeigten sich verringerte Level von TNF $\alpha$  und IL-6 unter Behandlung von Pioglitazon [99].

Neben den für eine Hemmung der Entzündungsvorgänge sprechenden Ergebnissen finden sich mit der signifikant erhöhten Expression von CX3CR1, TNF $\alpha$  und MMP-2 in der Choroidea interessanterweise jedoch auch Hinweise auf eine gesteigerte entzündliche Aktivität. Diese erhöhte Expression findet sich ausschließlich in der Choroidea, zwei Wochen nach Laserbehandlung. Die Kontrolluntersuchungen können zu diesem Zeitpunkt in der Choroidea keine veränderte Genexpression als Reaktion auf die Laserbehandlung selbst zeigen. Ob diese Erhöhung der Parameter als reaktive proinflammatorische Antwort auf eine ansonsten inhibierte Inflammation zu werten ist, eine kompensatorische Hochregulation durch etwaige nicht-inhibierte Immunzellen

darstellt, oder auf einen bislang unbekanntem Mechanismus der Pathogenese zurückgeht, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden.

Ein weiterer Schritt auf dem Weg der Evaluation von Pioglitazon als potentiellm Therapeutikum bei feuchter AMD wäre nun, mit Hilfe von angiographischen Untersuchungen den Einfluss von Pioglitazon auf das Ausmaß der Gefäßneubildungen in diesem Modell der CNV zu eruieren. Gegebenenfalls kann so der bereits gezeigte Einfluss von Pioglitazon auf morphologische Vorgänge des Augenhintergrundes weiter bestätigt werden.

Für die Pathogenese der AMD ist es interessant zu sehen, dass Pioglitazon auf Genexpressionsebene zumindest kurzfristig keinen direkten Einfluss auf die Bildung von VEGF zu haben scheint. Im Gegenteil erscheint sogar eine schwache, nicht signifikante, jedoch in allen Experimenten zu findende Tendenz hin zu einer leicht erhöhten Expression von VEGF unter Pioglitazonbehandlung zu bestehen. Hinweise hierauf finden sich in Bezug auf andere Organsysteme bereits in diversen Studien [17, 45, 152]. Um diesen Umstand weiter zu beleuchten wären Messungen des tatsächlichen VEGF-Vorkommens in den beobachteten Geweben interessant.

Einige der Veränderungen in den Untersuchungen zur Genexpression unter Pioglitazoneinfluss zeigen sich erst zu dem späteren Messzeitpunkt hin, wohingegen sich die initial durch die Laserbehandlung bewirkte erhöhte Genexpression von CX3CR1 und IL-1 $\beta$  nach zwei Wochen dem Wert der ungelaserten Gewebe annähert. Dies könnte, wie auch die Ergebnisse in der Autofluoreszenz, dafür sprechen, dass hier bei ausbleibendem Entzündungsreiz Normalisierungsvorgänge stattfinden. Neben der frühen Hochregulierung der Genexpression unter einem direkten Entzündungsreiz (ie Laserbehandlung), scheint Pioglitazon in Bezug auf die Genexpression auch eine längerfristige Wirkung zu entfalten. Die Frage, ob dies langfristig einen Einfluss auf die Pathogenese der AMD ausübt, bietet wie auch in den Autofluoreszenzuntersuchungen einen interessanten Ansatz für eine längerfristig angelegte Untersuchung der immunologischen Vorgänge des Augenhintergrundes. Hier könnte mit im zeitlichen Abstand mehrfach angewendeten Laserbehandlungen ein kontinuierlicher Entzündungsreiz simuliert werden.

## 5.2 Limitationen des Modells

### Laserbehandlung

Ein bedeutender Unterschied zwischen dem humanen Auge und dem einer Maus ist der, dass anders als in humanen Augen in Mäusen keine Makula zu finden ist. So mag es zunächst paradox erscheinen, Untersuchungen zur Makuladegeneration an murinen Augen durchzuführen. In dieser Arbeit wird jedoch ein direkter Einfluss auf die Sehschärfe nicht untersucht. Es stehen hier die allgemeinen degenerativen Vorgänge des Augenhintergrundes im Vordergrund, welche anhand dieses Mausmodells untersucht werden können. Die Verwendung von Lasern zur Erzeugung eines Reizes zur Simulation diverser Erkrankungen wird bereits seit Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen verwendet [37, 107, 135], zur besseren Interpretation der Ergebnisse werden die grundlegenden Untersuchungen unter eigenen Laborbedingungen erneut durchgeführt.

### Präparation Gewebe

Die Schwierigkeit der eindeutigen Zuordnung der Gewebe im Rahmen der Trennung von Retina und Choroidea wurde bereits angesprochen. Eine weitere Unabwägbarkeit ist das in den Gefäßen der Choroidea befindliche Blut. Nimmt man jedoch das ungefähre Blutvolumen von ca 6-7,5mL pro 100g Körpergewicht einer Maus an, hat eine Maus von 30g Körpergewicht insgesamt ein Blutvolumen von 1,8-2,25mL. Bei Annahme einer Kugelform des Mäuseauges und einer durchschnittlichen Länge eines murinen Augapfels von ca 3,4mm [106], berechnet sich die Oberfläche dieses Auges auf etwa 36,31mm<sup>2</sup>. Unter der Annahme, dass die Choroidea die Hälfte des Augapfels umspannt und eine durchschnittliche Dicke von etwa 0,017mm [31] aufweist, ergibt sich somit ein geschätztes Choroideavolumen von 0,617mm<sup>3</sup>, beziehungsweise 0,617µL. Somit macht das potentiell in der Choroidea befindliche Blutvolumen nur einen äußerst geringen Anteil des gesamten Blutvolumens aus, wodurch sich Veränderungen der Blutzusammensetzung nur unwesentlich auf Messungen der Choroidea niederschlagen.

### Autofluoreszenz

Autofluoreszenzbilder werden im Niveau der Retina aufgenommen. Hierzu wird zunächst in der klassischen Fundusbildgebung der optisch sichtbare Augenhintergrund mit den Laserherden aufgesucht und scharfgestellt. Die Feinjustierung des Autofluoreszenzbildes kann somit im Niveau der Retina stattfinden. Combadière et al. haben nachgewiesen, dass Mikrogliazellen die einzigen CX3CR1-positiven Zellen der Retina sind [29]. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die in der

Autofluoreszenz gemessenen, CX3CR1-positiven Signale Mikrogliazellen repräsentieren.

Die Veränderungen unter Einfluss von Pioglitazon zeigen sich in diesen Versuchen drei Tage und eine Woche nach Laserbehandlung. Nach zwei Wochen zeigt sich der Intensitätsquotient weiter auf einem niedrigen Niveau, jedoch zeigt der Intensitätsquotient in der Cellulosegruppe, nach initial hohem Anstieg als Reaktion auf die Laserbehandlung, bei Ausbleiben weiterer Reize einen deutlichen Rückgang, wodurch zwei Wochen nach Laserbehandlung kein Unterschied mehr zwischen der Cellulose- und Pioglitazon-behandelten Gruppe festzustellen ist. Der abnehmende Unterschied nach einer, beziehungsweise zwei Wochen könnte dafür sprechen, dass die Mikrogliazellen, insbesondere in der Kontrollgruppe, auf Grund ausbleibender Entzündungsvorgänge beginnen, sich wieder gleichmäßiger anzuordnen und möglicherweise auch wieder in den von Nimmerjahn et al. beschriebenen „überwachenden Zustand“ übergehen [97]. Dies zeigt eine mögliche Schwachstelle des angewendeten Mausmodells: Bei der AMD spielen chronische degenerative und entzündliche Vorgänge eine wesentliche Rolle [30], was in diesem Mausmodell anhand eines einzelnen akuten Entzündungsreizes simuliert wird. Modelle, in welchen ein kontinuierlicher Entzündungsreiz, beispielsweise über die mehrfache Laserbehandlung der Augen, dargeboten wird, könnten dieses Problem umgehen.

#### **Durchflusszytometrie ex-vivo**

Die Verwendung zusätzlicher Oberflächenmarker könnte die Differenzierung von Zellen erleichtern, deren Populationen sich im Rahmen der Auswertung mit den verwendeten Oberflächenmarkern überlappen und somit nicht klar voneinander abgrenzbar sind. Dies betrifft insbesondere die Gruppe der Zellen mit einer negativen Ausprägung des CD11b-Oberflächenmarkers, welche eine „intermediate“-Ausprägung von CX3CR1 aufweisen. Dieser bereits in der Beschreibung der Immunzellendifferenzierung angesprochene fließende Übergang verhindert eine Abgrenzung dieser Population.

Auch die im vorangegangenen Abschnitt beschriebene potentielle Fehlerquelle bei der Trennung von Retina und Choroidea könnte unter Umständen Einfluss auf die Ergebnisse der Durchflusszytometrie nehmen.

#### **RT-PCR ex-vivo**

Mit Hilfe der Real-Time-PCR können Einflüsse von Pioglitazon auf die immunologischen Vorgänge des Augenhintergrundes nachgewiesen werden. Es treten jedoch Diskrepanzen zwischen dem, nach der Untersuchung von ungetrennten Gewebeproben erwarteten, und den tatsächlichen Ergebnissen der einzeln gemessenen Gewebe von

Choroidea und Retina auf. Es ist davon auszugehen, dass die Trennung von Retina und Choroidea im Rahmen der Präparation an dem Ort des geringsten Zusammenhaltes zwischen Retina und Choroidea erfolgt. Dies bedeutet, dass die Trennung am wahrscheinlichsten im Bereich des mukopolysaccharidhaltigen subretinalen Raumes stattfindet, wodurch die Zellen des retinalen Pigmentepithels am ehesten dem Gewebe der Choroidea zugerechnet werden. Ändert sich diese Zuteilung nun durch Narbenbildungen, Anhaftungen und gegebenenfalls hierdurch bedingte Verluste von Gewebematerial im Rahmen der Präparation, kann dies die gemessene Genexpression der einzelnen Gewebe beeinflussen. Dies wäre insbesondere dann relevant, wenn sich im subretinalen Raum Zellen finden sollten, welche wesentlich an den untersuchten Genexpressionen beteiligt sind. Dieser Erklärungsansatz lässt vermuten, dass hier bedeutende immunologische Vorgänge stattfinden. Eine Methode, welche es erlaubt, die Vorgänge im subretinalen Raum gesondert zu messen, könnte spannende Erkenntnisse zu Erklärung der Pathogenese der AMD beisteuern.

### **5.3 Zusammenfassung**

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Einfluss des PPAR $\gamma$ -Agonisten Pioglitazon auf die Immunmodulation in einem Mausmodell der laserinduzierten CNV, der maßgeblichen pathologischen Veränderung der exsudativen Form der AMD. Hierzu wird das Migrationsverhalten von CX3CR1-exprimierenden Immunzellen des Augenhintergrundes untersucht, sowie durchflusszytometrisch die absolute und relative Anzahl von Immunzellen in der Netzhaut und Aderhaut bestimmt. Die Genexpression der an inflammatorischen Vorgängen beteiligten Zytokine wird relativ quantitativ gemessen.

In der vorliegenden Arbeit kann auf morphologischer Ebene nachgewiesen werden, dass Pioglitazon die Aktivierung und Migration von Mikrogliazellen in einem laserinduzierten Mausmodell der CNV bei AMD signifikant inhibiert. Dies kann anhand des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Laserherdintensitätsquotienten insbesondere für die früheren Zeitpunkte nach Laserbehandlung, also drei Tage und eine Woche gezeigt werden. Bei Ausbleiben weiterer Reize lässt sich dieser Einfluss zwei Wochen nach Laserbehandlung nicht mehr nachweisen.

Im Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse der Zellzahlen in Choroidea und Retina können Ergebnisse vorangegangener Untersuchungen, welche sich mit den Veränderungen der Zellzahlen als Reaktion auf die Laserbehandlung in dem

laserinduzierten CNV-Modell in der Maus befassten, bestätigt werden [37]. In den anschließenden Untersuchungen, welche die nähere Beleuchtung des Einflusses von Pioglitazon auf die Immunzellzahl in diesen Geweben zum Ziel haben, findet sich, abgesehen von einer signifikant verringerten Anzahl neutrophiler Granulozyten, welcher sich in der Choroidea eine Woche nach Laserbehandlung zeigt, kein signifikanter Einfluss von Pioglitazon auf die Immunzellzahl.

In dieser Arbeit kann jedoch gezeigt werden, dass Pioglitazon auf Genexpressionsebene Einfluss auf strukturelle Umbauvorgänge des Augenhintergrundes nimmt. So zeigt sich drei Tage nach Laserbehandlung eine signifikante Reduktion der Genexpression von TNF $\alpha$  in der Retina und von IL-1 $\beta$  in der Choroidea. Darüber hinaus zeigt sich zwei Wochen nach Laserbehandlung eine signifikante Reduktion des an Zellmigrations- und Gewebeumbauprozessen beteiligten MMP-9 sowohl in der Retina als auch in der Choroidea. Zwei Wochen nach Laserbehandlung zeigen sich insbesondere in der Choroidea weitere Veränderungen an der Genexpression, welche, entgegen unserer Erwartungen, für sich genommen eher für eine proinflammatorische Wirkung von Pioglitazon sprechen würden. Eine genauere Untersuchung dieser möglicherweise kompensatorisch hochregulierten Parameter könnte weiteres Licht auf das komplexe Zusammenspiel der Pathogenese der CNV werfen.

Durch die Kombination der verwendeten Analysen kann ein ausgeprägter Einfluss von Pioglitazon auf wesentliche Aspekte der Entwicklung der CNV im Rahmen der AMD nachgewiesen und das Verständnis der Pathogenese verbessert werden. Auch können die sich verdichtenden Hinweise eines wesentlichen Einflusses immunologischer Prozesse bei der Pathogenese der AMD weiter gefestigt werden. Darüber hinaus bietet der Einsatz von Pioglitazon einen interessanten Ansatz zur Therapie der AMD mit einem bereits etablierten Medikament. Inwieweit die Entwicklung der feuchten AMD von Pioglitazon langfristig beeinflusst wird, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Weitere Untersuchungen werden nötig sein, um einerseits die Pathogenese der AMD weiter zu beleuchten, andererseits den Einfluss von Pioglitazon auch auf eine langfristige immunmodulatorische und morphologische Wirkung zu klären.

Ein Überblick zu den bereits festgestellten sowie weiteren möglichen Interaktion von Pioglitazon im Rahmen von immunmodulatorischen Vorgängen findet sich in Abbildung 46.

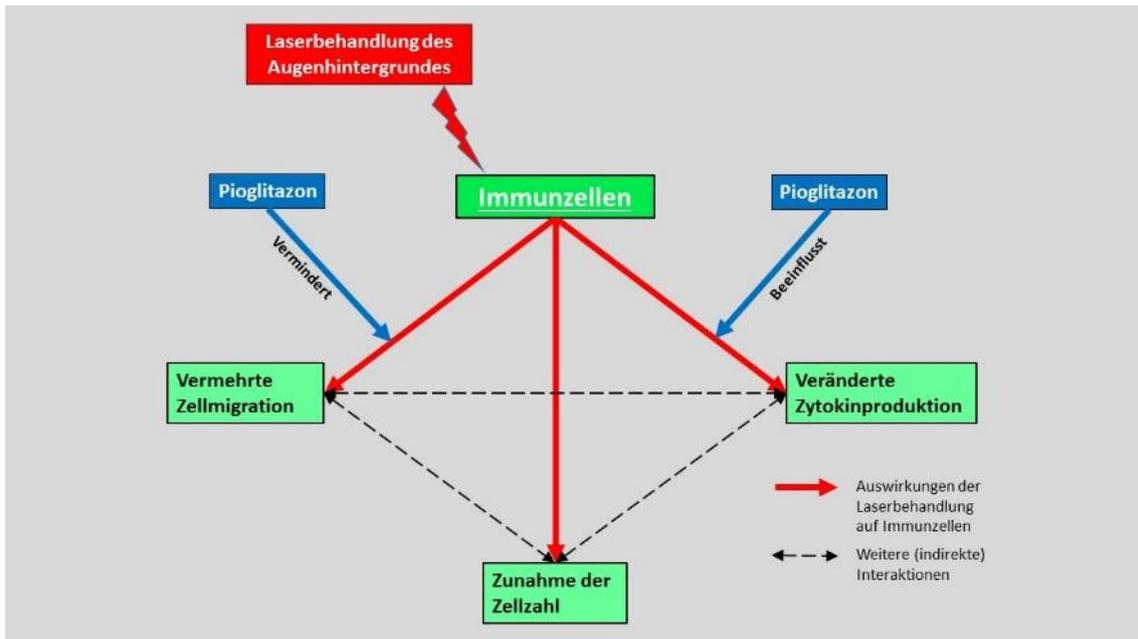


Abbildung 46: Überblick zu den in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Einflüssen von Pioglitazon auf die Immuzellregulation in einem laserinduzierten CNV-Modell

## I. Literaturverzeichnis

1. Abcouwer SF (2011) Neural inflammation and the microglial response in diabetic retinopathy. *Journal of ocular biology, diseases, and informatics* 4:25–33. doi: 10.1007/s12177-012-9086-x
2. Adamis AP, Shima DT, Yeo K-T, Yeo T-K, Brown, Lawrence F., Berse B, D'Amore PA, Folkman J (1993) Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. *biochemical and biophysical research communications* 193:631–638. doi: 10.1006/bbrc.1993.1671
3. Alex AF, Cordes S, Gietzelt C, Rohloff N, Heiduschka P, Eter N (2017) Quantification of optical in-vivo imaging of retinal and choroidal neovascularisation and cell migration in the mouse fundus. *Adv ophthalmol vis syst* 6:00186. doi: 10.15406/aovs.2017.06.00186
4. Al-Majed A, Bakheit AHH, Abdel Aziz HA, Alharbi H, Al-Jenoobi FI (2016) Pioglitazone. *Profiles drug subst excip relat methodol* 41:379–438. doi: 10.1016/bs.podrm.2015.11.002
5. Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, Ianchulev S, Adamis AP (2003) Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Survey of ophthalmology* 48:257–293. doi: 10.1016/S0039-6257(03)00030-4
6. Ambati J, Fowler BJ (2012) Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron* 75:26–39. doi: 10.1016/j.neuron.2012.06.018
7. AREDS (2001) A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch ophthalmol* 119:1417–1436. doi: 10.1001/archoph.119.10.1417
8. Auwerx J (1999) PPAR $\gamma$ , the ultimate thrifty gene. *Diabetologia* 42:1033–1049. doi: 10.1007/s001250051268
9. Bartz-Schmidt KU, Ziemssen F (2008) *Intravitreale Pharmakotherapie*, 1. Auflage. Schattauer, Stuttgart New York. S 79-107
10. Bartz-Schmidt U, Bertram B, Bornfeld N, Grisanti S, Holz F, Lemmen K, Pauleikhoff D, Roider J, Walter P (2007) Aktuelle therapeutische Möglichkeiten bei der neovaskulären altersabhängigen Makuladegeneration. *Der Ophthalmologe* 104:628–634. doi: 10.1007/s00347-007-1581-2
11. Bellmann C, Jorzik J, Spital G, Unnebrink K, Pauleikhoff D, Holz FG (2002) Symmetry of bilateral lesions in geographic atrophy in patients with

- age-related macular degeneration. *Arch ophthalmol* 120:579–584. doi: 10.1001/archopht.120.5.579
12. Berger J, Moller DE (2002) The mechanisms of action of PPARs. *Annual review of medicine* 53:409–435. doi: 10.1146/annurev.med.53.082901.104018
  13. Bernardo A, Levi G, Minghetti L (2000) Role of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) and its natural ligand 15-deoxy- $\Delta$ 12, 14-prostaglandin J2 in the regulation of microglial functions. *European journal of neuroscience* 12:2215–2223. doi: 10.1046/j.1460-9568.2000.00110.x
  14. Bhutto I, Lutty G (2012) Understanding age-related macular degeneration (AMD): Relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Molecular aspects of medicine* 33:295–317. doi: 10.1016/j.mam.2012.04.005
  15. Bindewald A, Jorzik JJ, Roth F, Holz FG (2005) cSLO-Fundusautofluoreszenz-Imaging: Methodische Weiterentwicklungen der konfokalen Scanning-Laser-Ophthalmoskopie. *Der Ophthalmologe* 102:259–264. doi: 10.1007/s00347-004-1121-2
  16. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, Chisholm IH, Coscas G, Davis MD, De Jong P, Klaver CCW, Klein BEK, Klein R, Mitchell P, Sarks JP, Sarks SH, Soubrane G, Taylor HR, Vingerling JR (1995) An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. *Survey of ophthalmology* 39:367–374. doi: 10.1097/iio.0b013e31802bd785
  17. Biscetti F, Straface G, Arena V, Stigliano E, Pecorini G, Rizzo P, De Angelis G, Iuliano L, Ghirlanda G, Flex A (2009) Pioglitazone enhances collateral blood flow in ischemic hindlimb of diabetic mice through an Akt-dependent VEGF-mediated mechanism, regardless of PPAR $\gamma$  stimulation. *Cardiovascular diabetology* 8:49. doi: 10.1186/1475-2840-8-49
  18. Bockelbrink A, Roll S, Ruether K, Rasch A, Greiner W, Willich SN (2008) Cataract surgery and the development or progression of age-related macular degeneration: a systematic review. *Survey of ophthalmology* 53:359–367. doi: 10.1016/j.survophthal.2008.04.001
  19. Braissant O, Fougelle F, Scotto C, Dauça M, Wahli W (1996) Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137:354–366. doi: 10.1210/en.137.1.354
  20. Brown DM, Kaiser PK, Michels M, Soubrane G, Heier JS, Kim RY, Sy JP, Schneider S (2006) Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-

related macular degeneration. *New England Journal of Medicine* 355:1432–1444. doi: 10.1056/nejmoa062655

21. Cardona AE, Piro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, Huang D, Kidd G, Dombrowski S, Dutta R, Lee J-C, Cook DN, Jung S, Lira SA, Littman DR, Ransohoff RM (2006) Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature Neuroscience* 9:917–924. doi: 10.1038/nn1715
22. Chang K, Francis SA, Aikawa E, Figueiredo J-L, Kohler RH, McCarthy JR, Weissleder R, Plutzky J, Jaffer FA (2010) Pioglitazone suppresses inflammation in vivo in murine carotid atherosclerosis: novel detection by dual-target fluorescence molecular imaging. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30:1933–1939. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.206342
23. Chau KY, Sivaprasad S, Patel N, Donaldson TA, Luthert PJ, Chong NV (2007) Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 and-9 (MMP-2 and MMP-9) in age-related macular degeneration. *Eye* 22:855–859. doi: 10.1038/sj.eye.6702722
24. Chen M, Forrester JV, Xu H (2007) Synthesis of complement factor H by retinal pigment epithelial cells is down-regulated by oxidized photoreceptor outer segments. *Experimental Eye Research* 84:635–645. doi: 10.1016/j.exer.2006.11.015
25. Chen R, Yan J, Liu P, Wang Z (2015) Effects of thiazolidinedione therapy on inflammatory markers of type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Plos one* 10:e0123703. doi: 10.1371/journal.pone.0123703
26. Cheng Y, Huang L, Li X, Zhou P, Zeng W, Zhang C (2013) Genetic and functional dissection of ARMS2 in age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. *Plos one* 8:e53665. doi: 10.1371/journal.pone.0053665
27. Chinnam P, Mohsin M, Shafee LM (2012) Evaluation of acute toxicity of pioglitazone in mice. *Toxicol Int* 19:250–254. doi: 10.4103/0971-6580.103660
28. Chinnery HR, Ruitenberg MJ, Plant GW, Pearlman E, Jung S, McMenamin PG (2007) The chemokine receptor CX3CR1 mediates homing of MHC class II-positive cells to the normal mouse corneal epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48:1568–1574. doi: 10.1167/iovs.06-0746
29. Combadière C, Feumi C, Raoul W, Keller N, Rodéro M, Pézard A, Lavalette S, Houssier M, Jonet L, Picard E, Debré P, Sirinyan M, Deterre P, Ferroukhi T, Cohen S-Y, Chauvaud D, Jeanny J-C, Chemtob S, Behar-Cohen F, Sennlaub F (2007) CX3CR1-dependent subretinal microglia cell

- accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *Journal of clinical investigation* 117:2920–2928. doi: 10.1172/JCI31692
30. De Jong PT (2006) Age-related macular degeneration. *New england journal of medicine* 355:1474–1485. doi: 10.1056/nejmra062326
  31. Demetriades AM, Deering T, Liu H, Lu L, Gehlbach P, Packer JD, Gabhann FM, Popel AS, Wei LL, Campochiaro PA (2008) Trans-scleral delivery of antiangiogenic proteins. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics* 24:70–79. doi: 10.1089/jop.2007.0061
  32. Drew PD, Johnson JW, Douglas JC, Phelan KD, Kane CJM (2015) Pioglitazone blocks ethanol induction of microglial activation and immune responses in the hippocampus, cerebellum, and cerebral cortex in a mouse model of fetal alcohol spectrum disorders. *Alcoholism: Clinical and experimental research* 39:445–454. doi: 10.1111/acer.12639
  33. Eckland DA, Danhof M (2000) Clinical pharmacokinetics of pioglitazone. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes* 108:234–242. doi: 10.1055/s-2000-8525
  34. Elshama SS, El-Kenawy AE-M, Osman H-EH (2016) Toxicological evaluation of subchronic use of pioglitazone in mice. *Iranian journal of basic medical sciences* 19:712
  35. Eter N (2009) Die altersabhängige Makuladegeneration, 2. Auflage. Uni-Med Science. S 14-62
  36. Eter N, Bindewald A, Roth F, Holz FG (2004) OCT bei altersabhängiger Makuladegeneration: Befunde, Einsatz in der klinischen Routine, Beurteilung des Therapieverlaufs. *Der Ophthalmologe* 101:794–803. doi: 10.1007/s00347-004-1052-y
  37. Eter N, Engel DR, Meyer L, Helb H-M, Roth F, Maurer J, Holz FG, Kurts C (2008) In vivo visualization of dendritic cells, macrophages, and microglial cells responding to laser-induced damage in the fundus of the eye. *Investigative ophthalmology & visual science* 49:3649–3658. doi: 10.1167/iovs.07-1322
  38. Evans J (2008) Antioxidant supplements to prevent or slow down the progression of AMD: a systematic review and meta-analysis. *Eye* 22:751–760. doi: 10.1038/eye.2008.100
  39. Evans JR (2001) Risk factors for age-related macular degeneration. *Progress in retinal and eye research* 20:227–253. doi: 10.1016/s1350-9462(00)00023-9
  40. Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre A-M, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart J-C, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR,

- Staels B, Vidal H, Auwerx J (1997) The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR gene. *Journal of biological chemistry* 272:18779–18789. doi: 10.1074/jbc.272.30.18779
41. Fajas L, Fruchart J-C, Auwerx J (1998) PPAR $\gamma$ 3 mRNA: a distinct PPAR $\gamma$  mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS letters* 438:55–60. doi: 10.1016/s0014-5793(98)01273-3
  42. Fang I-M, Lin C-P, Yang C-M, Chen M-S, Yang C-H (2005) Expression of CX3C chemokine, fractalkine, and its receptor CX3CR1 in experimental autoimmune anterior uveitis. *Mol vis* 11:443–451
  43. Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W (2005) Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochemical and biophysical research communications* 333:328–335. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.05.132
  44. Frey T (1995) Nucleic acid dyes for detection of apoptosis in live cells. *Cytometry* 21:265–274. doi: 10.1002/cyto.990210307
  45. Gealekman O, Burkart A, Chouinard M, Nicoloso SM, Straubhaar J, Corvera S (2008) Enhanced angiogenesis in obesity and in response to PPAR activators through adipocyte VEGF and ANGPTL4 production. *AJP: Endocrinology and metabolism* 295:E1056–E1064. doi: 10.1152/ajpendo.90345.2008
  46. Geissmann F, Jung S, Littman DR (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19:71–82. doi: 10.1016/s1074-7613(03)00174-2
  47. Giansanti R, Fumelli C, Boemi M, Fumelli P (1996) Age-related macular disease in diabetes mellitus. *Archives of gerontology and geriatrics* 5:473–476. doi: 10.1016/0167-4943(96)86985-8
  48. Gold B, Merriam JE, Zernant J, Hancox LS, Taiber AJ, Gehrs K, Cramer K, Neel J, Bergeron J, Barile GR, Smith RT, Hageman GS, Dean M, Allikmets R, Chang S, Yannuzzi LA, Merriam JC, Barbazetto I, Lerner LE, Russell S, Hoballah J, Hageman J, Stockman H (2006) Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nature genetics* 38:458–462. doi: 10.1038/ng1750
  49. Grehn F (2008) *Augenheilkunde*, 30. Auflage. Springer, Heidelberg. S 190-208
  50. Grossniklaus HE, Green WR (2004) Choroidal neovascularization. *American journal of ophthalmology* 137:496–503. doi: 10.1016/j.ajo.2003.09.042

51. Grunwald JE, Hariprasad SM, DuPont J (1998) Effect of aging on foveolar choroidal circulation. *Arch ophthalmol* 116:150–154. doi: 10.1001/archopht.116.2.150
52. Grunwald JE, Metelitsina TI, DuPont JC, Ying G-S, Maguire MG (2005) Reduced foveolar choroidal blood flow in eyes with increasing AMD severity. *Investigative ophthalmology & visual science* 46:1033–1038. doi: 10.1167/iovs.04-1050
53. Guymer R, Luthert P, Bird A (1999) Changes in Bruch's membrane and related structures with age. *Progress in retinal and eye research* 18:59–90. doi: 10.1016/S1350-9462(98)00012-3
54. Haab O (1985) Erkrankungen der Macula lutea. *Centralblatt für praktische Augenheilkunde* 9:383–384
55. Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, Hancox LS, Taiber AJ, Hardisty LI, Hageman JL, Stockman HA, Borchardt JD, Gehrs KM, Smith RJH, Silvestri G, Russell SR, Klaver CCW, Barbazetto I, Chang S, Yannuzzi LA, Barile GR, Merriam JC, Smith RT, Olsh AK, Bergeron J, Zernant J, Merriam JE, Gold B, Dean M, Allikmets R (2005) A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 102:7227–7232. doi: 10.1073/pnas.0501536102
56. Haines JL (2005) Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* 308:419–421. doi: 10.1126/science.1110359
57. Heiduschka P, Fietz H, Hofmeister S, Schultheiss S, Mack AF, Peters S, Ziemssen F, Niggemann B, Julien S, Bartz-Schmidt KU, Schraermeyer U, and The Tübingen Bevacizumab Study Group (2007) Penetration of bevacizumab through the retina after intravitreal injection in the monkey. *Investigative ophthalmology & visual science* 48:2814–2823. doi: 10.1167/iovs.06-1171
58. Herzlich AA, Ding X, Shen D, Ross RJ, Tuo J, Chan C-C (2009) Peroxisome proliferator-activated receptor expression in murine models and humans with age-related macular degeneration. *The open biology journal* 2:141. doi: 10.2174/1874196700902010141
59. Herzlich AA, Tuo J, Chan C-C (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor and age-related macular degeneration. *PPAR research* 2008:1–11. doi: 10.1155/2008/389507
60. Holtkamp GM, Kijlstra A, Peek R, de Vos AF (2001) Retinal pigment epithelium-immune system interactions: cytokine production and cytokine-

- induced changes. *Progress in retinal and eye research* 20:29–48. doi: 10.1016/s1350-9462(00)00017-3
61. Holz FG (2011) *Altersabhängige Makuladegeneration mit 21 Tabellen*, 3. Auflage. Springer, Berlin [u.a.]. S 4-270
  62. Holz FG, Bellmann C, Margaritidis M, Schütt F, Otto TP, Völcker HE (1999) Patterns of increased in vivo fundus autofluorescence in the junctional zone of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium associated with age-related macular degeneration. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology* 237:145–152. doi: 10.1007/s004170050209
  63. Hume DA, Perry VH, Gordon S (1983) Immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: phagocytosis of dying neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. *The journal of cell biology* 97:253–257. doi: 10.1083/jcb.97.1.253
  64. Ishibazawa A, Nagaoka T, Yokota H, Ono S, Yoshida A (2013) Low shear stress up-regulation of proinflammatory gene expression in human retinal microvascular endothelial cells. *Experimental eye research* 116:308–311. doi: 10.1016/j.exer.2013.10.001
  65. Jager RD, Mieler WF, Miller JW (2008) Age-related macular degeneration. *New england journal of medicine* 358:2606–2617. doi: 10.1056/nejmra0801537
  66. Jiang C, Ting AT, Seed B (1998) PPAR- $\gamma$  agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391:82–86. doi: 10.1038/34184
  67. Jonas JB, Schneider U, Naumann GO (1992) Count and density of human retinal photoreceptors. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology* 230:505–510. doi: 10.1007/bf00181769
  68. Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR (2000) Analysis of fractalkine receptor CX3CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Molecular and cellular biology* 20:4106–4114. doi: 10.1128/MCB.20.11.4106-4114.2000
  69. Junius P, Kuhnt H (1926) Die scheibenförmige Entartung der Netzhautmitte (Degeneratio maculae luteae disciformis)
  70. Kaplan J, Nowell M, Chima R, Zingarelli B (2014) Pioglitazone reduces inflammation through inhibition of NF $\kappa$ B in polymicrobial sepsis. *Innate immunity* 20:519–528. doi: 10.1177/1753425913501565
  71. Kersten S, Desvergne B, Wahli W (2000) Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 405:421–424. doi: 10.1038/35013000

72. Klein R, Chou C-F, Klein BE, Zhang X, Meuer SM, Saaddine JB (2011) Prevalence of age-related macular degeneration in the US population. *Arch ophthalmol* 129:75–80. doi: 10.1001/archophthalmol.2010.318
73. Klein R, Davis M, Magli Y, Segal P, Klein B, Hubbard L (1991) The Wisconsin age-related maculopathy grading system. *Ophthalmology* 98:1128–1134. doi: 10.1016/s0161-6420(91)32186-9
74. Klein RJ (2005) Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 308:385–389. doi: 10.1126/science.1109557
75. Krause TA, Alex AF, Engel DR, Kurts C, Eter N (2014) VEGF-production by CCR2-dependent macrophages contributes to laser-induced choroidal neovascularization. *Plos one* 9:e94313. doi: 10.1371/journal.pone.0094313
76. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Nagai R, Tobe K, Kimura S, Kadowaki T (1999) PPAR $\gamma$  mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Molecular cell* 4:597–609. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80210-5
77. Kuroki M, Voest EE, Amano S, Beerepoot LV, Takashima S, Tolentino M, Kim RY, Rohan RM, Colby KA, Yeo K-T, Adamis AP (1996) Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Journal of clinical investigation* 98:1667. doi: 10.1172/jci118962
78. Lafaut BA, Bartz-Schmidt KU, Broecke CV, Aisenbrey S, De Laey JJ, Heimann K (2000) Clinicopathological correlation in exudative age related macular degeneration: histological differentiation between classic and occult choroidal neovascularisation. *British journal of ophthalmology* 84:239–243. doi: 10.1136/bjo.84.3.239
79. Lambert V, Lecomte J, Hansen S, Blacher S, Gonzalez M-LA, Struman I, Sounni NE, Rozet E, de Tullio P, Foidart JM, Rakic J-M, Noel A (2013) Laser-induced choroidal neovascularization model to study age-related macular degeneration in mice. *Nature protocols* 8:2197–2211. doi: 10.1038/nprot.2013.135
80. Lambert V, Wielockx B, Munaut C, Galopin C, Jost M, Itoh T, Werb Z, Baker A, Libert C, Krell H-W, Foidart J-M, Noel A, Rakic J-M (2003) MMP-2 and MMP-9 synergize in promoting choroidal neovascularization. *The FASEB journal* 17:2290–2292. doi: 10.1096/fj.03-0113fje

81. Latt SA, Stetten G (1976) Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis. *J histochem cytochem* 24:24–33. doi: 10.1177/24.1.943439
82. Luo C, Zhao J, Madden A, Chen M, Xu H (2013) Complement expression in retinal pigment epithelial cells is modulated by activated macrophages. *Experimental eye research* 112:93–101. doi: 10.1016/j.exer.2013.04.016
83. Lyons AB, Parish CR (1994) Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *Journal of immunological methods* 171:131–137. doi: 10.1016/0022-1759(94)90236-4
84. Ma W, Zhao L, Fontainhas AM, Fariss RN, Wong WT (2009) Microglia in the mouse retina alter the structure and function of retinal pigmented epithelial cells: a potential cellular interaction relevant to AMD. *Plos one* 4:e7945. doi: 10.1371/journal.pone.0007945
85. Maeshiba Y, Kiyota Y, Yamashita K, Yoshimura Y, Motohashi M, Tanayama S (1997) Disposition of the new antidiabetic agent pioglitazone in rats, dogs, and monkeys. *Arzneimittelforschung* 47:29–35
86. Maguire MGG, Bressler SB, Bressler NM, Alexander J, Hiner CJ, Javornik NB, Phillips D, Marsh MJ, Hawkins BS, Burgess DB, Chandra S, Klein ML, Orth DH, Stevens T, Fine SL (1997) Risk factors for choroidal neovascularization in the second eye of patients with juxtafoveal or subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Arch ophthalmol* 115:741–747. doi: 10.1001/archopht.1997.01100150743009
87. Manikandan S (2011) Measures of central tendency: Median and mode. *Journal of pharmacology and pharmacotherapeutics* 2:214. doi: 10.4103/0976-500X.83300
88. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* 25:677–686. doi: 10.1016/j.it.2004.09.015
89. Margolis R, Spaide RF (2009) A pilot study of enhanced depth imaging optical coherence tomography of the choroid in normal eyes. *American Journal of ophthalmology* 147:811–815. doi: 10.1016/j.ajo.2008.12.008
90. McLeod DS, Bhutto I, Edwards MM, Silver RE, Seddon JM, Lutty GA (2016) Distribution and quantification of choroidal macrophages in human eyes with age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science* 57:5843. doi: 10.1167/iovs.16-20049

91. Mitchell P, Smith W, Attebo K, Wang JJ (1995) Prevalence of age-related maculopathy in australia: the blue mountains eye study. *Ophthalmology* 102:1450–1460. doi: 10.1016/s0161-6420(95)30846-9
92. Moore DJ, Hussain AA, Marshall J (1995) Age-related variation in the hydraulic conductivity of Bruch's membrane. *Investigative ophthalmology & visual science* 36:1290–1297
93. Mukherjee R, Davies PJA, Crombie DL, Bischoff ED, Caesario RM, Jow L, Hamann LG, Boehm MF, Mondon CE, Nadzan AM, Paterniti Jr JR, Heyman RA (1997) Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists. *Nature* 386:407–410. doi: 10.1038/386407a0
94. Murata T, He S, Hangai M, Ishibashi T, Xi X-P, Kim S, Hsueh WA, Ryan SJ, Law RE, Hinton DR (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  ligands inhibit choroidal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science* 41:2309–2317
95. Nanki T, Imai T, Nagasaka K, Urasaki Y, Nonomura Y, Taniguchi K, Hayashida K, Hasegawa J, Yoshie O, Miyasaka N (2002) Migration of CX3CR1-positive T cells producing type 1 cytokines and cytotoxic molecules into the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & rheumatism* 46:2878–2883. doi: 10.1002/art.10622
96. Neely JG, Hartman JM, Forsen JW, Wallace MS (2003) Tutorials in clinical research: VII. Understanding comparative statistics (contrast)—part B: Application of T-test, Mann-Whitney U, and Chi-Square. *The laryngoscope* 113:1719–1725. doi: 10.1097/00005537-200310000-00011
97. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314–1318. doi: 10.1126/science.1115247
98. Okamoto N, Tobe T, Hackett SF, Ozaki H, Vinore MA, LaRochelle W, Zack DJ, Campochiaro PA (1997) Transgenic mice with increased expression of vascular endothelial growth factor in the retina: a new model of intraretinal and subretinal neovascularization. *The american journal of pathology* 151:281
99. Okunuki Y, Usui Y, Nakagawa H, Tajima K, Matsuda R, Ueda S, Hattori T, Kezuka T, Goto H (2013) Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonist pioglitazone suppresses experimental autoimmune uveitis. *Experimental eye research* 116:291–297. doi: 10.1016/j.exer.2013.09.017
100. Pagenstecher H, Genth C (1875) *Atlas der pathologischen Anatomie des Augapfels*. CW Kreidel, Wiesbaden
101. Paques M, Simonutti M, Roux MJ, Picaud S, Levavasseur E, Bellman C, Sahel J-A (2006) High resolution fundus imaging by confocal scanning

- laser ophthalmoscopy in the mouse. *Vision research* 46:1336–1345. doi: 10.1016/j.visres.2005.09.037
102. Patel M, Chan C-C (2008) Immunopathological aspects of age-related macular degeneration. *Seminars in immunopathology* 30:97–110. doi: 10.1007/s00281-008-0112-9
  103. Pauleikoff D, Bornfeld N, Gabel V-P, Holz F, Roeder H (2005) Konsenspapier der Retinologischen Gesellschaft, der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft und des Berufsverbandes der Augenärzte. Stellungnahme zu aktuellen Therapie der neovaskulären AMD. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 222:381–388. doi: 10.1055/s-2005-858225
  104. Penfold PL, Madigan MC, Gillies MC, Provis JM (2001) Immunological and aetiological aspects of macular degeneration. *Progress in retinal and eye research* 20:385–414. doi: 10.1016/s1350-9462(00)00025-2
  105. Pinto M, Nissanka N, Peralta S, Brambilla R, Diaz F, Moraes CT (2016) Pioglitazone ameliorates the phenotype of a novel Parkinson's disease mouse model by reducing neuroinflammation. *Molecular neurodegeneration* 11:11:25. doi: 10.1186/s13024-016-0090-7
  106. Puk O, Dalke C, Favor J, Angelis MH, Graw J (2006) Variations of eye size parameters among different strains of mice. *Mammalian genome* 17:851–857. doi: 10.1007/s00335-006-0019-5
  107. Qiao H, Lucas K, Stein-Streilein J (2009) Retinal laser burn disrupts immune privilege in the eye. *The american journal of pathology* 174:414–422. doi: 10.2353/ajpath.2009.080766
  108. Qiu D, Li X-N (2015) Pioglitazone inhibits the secretion of proinflammatory cytokines and chemokines in astrocytes stimulated with lipopolysaccharide. *Int j clin pharmacol Ther* 53:746–752. doi: 10.5414/CP202339
  109. Radhika B, Vijayakumar S, Dhanpal R (2012) A pharmacokinetic interaction of pioglitazone and its clinical applications: a short review. *Int j pharm sci letters* 2:1–9
  110. Ramrattan RS, van der Schaft TL, Mooy CM, De Bruijn WC, Mulder PG, De Jong PT (1994) Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging. *Investigative ophthalmology & visual science* 35:2857–2864
  111. Raphael KL, Strait KA, Stricklett PK, Baird BC, Piontek K, Germino GG, Kohan DE (2009) Effect of pioglitazone on survival and renal function in a mouse model of polycystic kidney disease. *American journal of nephrology* 30:468–473. doi: 10.1159/000242432

112. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391:79–82. doi: 10.1038/34178
113. Romaniuk W (2014) Age-related macular degeneration and changes in the extracellular matrix. *Medical science monitor* 20:1003–1016. doi: 10.12659/MSM.889887
114. Roque RS, Rosales AA, Jingjing L, Agarwal N, Al-Ubaidi MR (1999) Retina-derived microglial cells induce photoreceptor cell death in vitro. *Brain research* 836:110–119. doi: 10.1016/s0006-8993(99)01625-x
115. Rosenfeld PJ (2006) Intravitreal avastin: the low cost alternative to lucentis? *American journal of ophthalmology* 142:141–143. doi: 10.1016/j.ajo.2006.03.036
116. SanGiovanni JP, Chew EY, Agrón E, Clemons TE, Ferris FL, Gensler G, Lindblad AS, Milton RC, Seddon JM, Klein R, others (2008) The relationship of dietary  $\omega$ -3 long-chain polyunsaturated fatty acid intake with incident age-related macular degeneration: AREDS report No. 23. *Archives of ophthalmology* 126:1274–1279. doi: 10.1001/archophth.126.9.1274
117. Sarks SH (1973) New vessel formation beneath the retinal pigment epithelium in senile eyes. *The British journal of ophthalmology* 57:951. doi: 10.1136/bjo.57.12.951
118. Sarwar S, Clearfield E, Soliman MK, Sadiq MA, Baldwin AJ, Hanout M, Agarwal A, Sepah YJ, Do DV, Nguyen QD (2016) Aflibercept for neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane database of systematic reviews* 2: CD011346. doi: 10.1002/14651858.CD011346.pub2
119. Sattler H (1876) Ueber den feineren Bau der Chorioidea des Menschen. *Albrecht von Graefes Archiv für Ophthalmologie* 22:1–100. doi: doi.org/10.1007/bf01705015
120. Schmidt S, Klaver CC, Saunders AM, Postel EA, De La Paz MA, Agarwal A, Small KW, Udar N, Ong JM, Chalukya MV, others (2002) A pooled case-control study of the apolipoprotein E (APOE) gene in age-related maculopathy. *Ophthalmic genetics* 23:209–223. doi: 10.1076/opge.23.4.209.13883
121. Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols* 3:1101–1108. doi: 10.1038/nprot.2008.73
122. Schmitz-Valckenberg S, Fleckenstein M, Helb H-M, Issa PC, Scholl HP, Holz FG (2009) In vivo imaging of foveal sparing in geographic atrophy

- secondary to age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science* 50:3915–3921. doi: 10.1167/iov.08-2484
123. Scholl HPN, Issa PC, Walier M, Janzer S, Pollok-Kopp B, Börncke F, Fritsche LG, Chong NV, Fimmers R, Wienker T, Holz FG, Weber BHF, Oppermann M (2008) Systemic complement activation in age-related macular degeneration. *Plos one* 3:e2593. doi: 10.1371/journal.pone.0002593
  124. Schoonjans K, Martin G, Staels B, Auwerx J (1997) Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions. *Current opinion in lipidology* 8:159–166. doi: 10.1097/00041433-199706000-00006
  125. Schwesinger C, Yee C, Rohan RM, Jousseaume AM, Fernandez A, Meyer TN, Poulaki V, Ma JJ, Redmond TM, Liu S, others (2001) Intrachoroidal neovascularization in transgenic mice overexpressing vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium. *The american journal of pathology* 158:1161–1172. doi: 10.1016/s0002-9440(10)64063-1
  126. Seagle B-LL, Rezai KA, Kobori Y, Gasyna EM, Rezaei KA, Norris JR (2005) Melanin photoprotection in the human retinal pigment epithelium and its correlation with light-induced cell apoptosis. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 102:8978–8983. doi: 10.1073/pnas.0501971102
  127. Smith W, Assink J, Klein R, Mitchell P, Klaver CC, Klein BE, Hofman A, Jensen S, Wang JJ, de Jong PT (2001) Risk factors for age-related macular degeneration: pooled findings from three continents. *Ophthalmology* 108:697–704. doi: 10.1016/s0161-6420(00)00580-7
  128. Smith W, Mitchell P, Leeder SR, Wang JJ (1998) Plasma fibrinogen levels, other cardiovascular risk factors, and age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study. *Arch ophthalmol* 116:583–587. doi: 10.1001/archophth.116.5.583
  129. Solomon SD, Lindsley K, Vedula SS, Krzystolik MG, Hawkins BS (2014) Anti-vascular endothelial growth factor for neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane database of systematic reviews*. doi: 10.1002/14651858.CD005139.pub3.
  130. Sood V, Colleran K, Burge MR (2000) Thiazolidinediones: a comparative review of approved uses. *Diabetes technology & therapeutics* 2:429–440. doi: 10.1089/15209150050194297
  131. Spaide RF (2006) Rationale for combination therapies for choroidal neovascularization. *American journal of ophthalmology* 141:149–156. doi: 10.1016/j.ajo.2005.07.025

132. Spalton DJ (1996) Atlas der Augenkrankheiten, 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. S 208-402
133. Starita C, Hussain AA, Pagliarini S, Marshall J (1996) Hydrodynamics of ageing Bruch's membrane: implications for macular disease. *Experimental eye research* 62:565–572. doi: 10.1006/exer.1996.0066
134. Steen B, Sejersen S, Berglin L, Seregard S, Kvanta A (1998) Matrix metalloproteinases and metalloproteinase inhibitors in choroidal neovascular membranes. *Investigative ophthalmology & visual science* 39:2194–2200
135. Stein-Streilein J (2013) Mechanisms of immune privilege in the posterior eye. *International reviews of immunology* 32:42–56. doi: 10.3109/08830185.2012.740535
136. Storer PD, Xu J, Chavis J, Drew PD (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists inhibit the activation of microglia and astrocytes: Implications for multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 161:113–122. doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.12.015
137. Streilein JW (2003) Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nature reviews immunology* 3:879–889. doi: 10.1038/nri1224
138. Sunness JS, Gonzalez-Baron J, Applegate CA, Bressler NM, Tian Y, Hawkins B, Barron Y, Bergman A (1999) Enlargement of atrophy and visual acuity loss in the geographic atrophy form of age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 106:1768–1779. doi: 10.1016/s0161-6420(99)90340-8
139. Sunness JS, Gonzalez-Baron J, Bressler NM, Hawkins B, Applegate CA (1999) The development of choroidal neovascularization in eyes with the geographic atrophy form of age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 106:910–919. doi: 10.1016/s0161-6420(99)00509-6
140. Sunness JS, Rubin GS, Applegate CA, Bressler NM, Marsh MJ, Hawkins BS, Haselwood D (1997) Visual function abnormalities and prognosis in eyes with age-related geographic atrophy of the macula and good visual acuity. *Ophthalmology* 104:1677–1691. doi: 10.1016/s0161-6420(97)30079-7
141. Swanson CR, Joers V, Bondarenko V, Brunner K, Simmons HA, Ziegler TE, Kemnitz JW, Johnson JA, Emborg ME (2011) The PPAR-g agonist pioglitazone modulates inflammation and induces neuroprotection in parkinsonian monkeys. *Journal of neuroinflammation* 8:91. doi: 10.1186/1742-2094-8-91

142. Takeda Pharmaceuticals America Inc. Actos (pioglitazone hydrochloride) tablets prescribing information [Internet]. In: <https://general.takedapharm.com/actospi>. Abgerufen 2. Nov 2018
143. The Jackson Laboratory Body Weight Information for C57BL/6J (000664) [Internet]. <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/strain-data-sheet-pages/body-weight-chart-000664>. Abgerufen 2. Nov 2018
144. The NCBI Handbook [Internet]. 2nd edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2013-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK143764/>. Abgerufen 2. Nov 2018
145. Thorp E, Kuriakose G, Shah YM, Gonzalez FJ, Tabas I (2007) Pioglitazone increases macrophage apoptosis and plaque necrosis in advanced atherosclerotic lesions of nondiabetic low-density lipoprotein receptor null mice. *Circulation* 116:2182–2190. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.698852
146. Tomany SC, Cruickshanks KJ, Klein R, Klein BE, Knudtson MD (2004) Sunlight and the 10-year incidence of age-related maculopathy. The beaver dam eye study. *Archophthalmol* 122:750–757. doi: 10.1001/archophth.122.5.750
147. UZH - Methodenberatung - Mann-Whitney-U-Test [Internet]. [http://www.methodhttps://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse\\_spss/unterschiede/zentral/mann.html](http://www.methodhttps://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse_spss/unterschiede/zentral/mann.html). Abgerufen 2. Nov 2018
148. Von Rückmann A, Fitzke FW, Bird AC (1997) Fundus autofluorescence in age-related macular disease imaged with a laser scanning ophthalmoscope. *Investigative ophthalmology & visual science* 38:478–486
149. Walport MJ (2001) Complement. *New england journal of medicine* 344:1058–1066. doi: 10.1056/nejm200104123441506
150. Xu H, Chen M, Forrester JV (2009) Para-inflammation in the aging retina. *Progress in retinal and eye research* 28:348–368. doi: 10.1016/j.preteyeres.2009.06.001
151. Yki-Järvinen H (2004) Thiazolidinediones. *New england journal of medicine* 351:1106–1118. doi: 10.1056/nejmra041001
152. Yoshizaki T, Motomura W, Tanno S, Kumei S, Yoshizaki Y, Tanno S, Okumura T (2010) Thiazolidinediones enhance vascular endothelial growth factor expression and induce cell growth inhibition in non-small-cell lung cancer cells. *Journal of experimental & clinical cancer research* 29:1–9. doi: 10.1186/1756-9966-29-22

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: gesundes Auge einer 16-jährigen Frau, geographische Atrophie im Auge eines 72-jährigen Mannes und CNV im Auge einer 82-jährigen Frau (von links nach rechts) .....	11
Abbildung 2: humane retinale Endothelzellen in Zellkultur .....	28
Abbildung 3: Überblick Experimentaufbau Mausmodell .....	30
Abbildung 4: Darstellung der Messung von Laserherdintensität und Peripherieintensität, Durchmesser der Messareale 116 Pixel .....	33
Abbildung 5: Beispiel zum Vorgehen zur Differenzierung der Immunzellen.....	38
Abbildung 6: Mediane der absoluten Zellzahlen Höchst-gefärbter Zellen unter den unterschiedlich behandelten Gruppen nach 24h, 48h und 72h (von links nach rechts).....	43
Abbildung 7: Mediane der MFI-Werte CFSE gefärbter Zellen unter den unterschiedlich behandelten Gruppen nach 24h, 48h und 72h (von links nach rechts).....	43
Abbildung 8: Überblick Teilungszyklen der hREZ-Zellen in Zellkultur.....	43
Abbildung 9: oben: Teilungszyklen [Kontrolle, DMSO80, Pio80] nach 24h, 48h und 72h (von links nach rechts); unten: Mediane MFI-Werte CFSE-gefärbter Zellen [Kontrolle, DMSO80, Pio80] nach 24h, 48h und 72h (von links nach rechts) .....	44
Abbildung 10: Ergebnisse des Medianvergleichs der Gesamtzellzahl in Choroidea (oben) und Retina (unten) in Abhängigkeit der Laserbehandlung im Zeitablauf .....	46
Abbildung 11: Laserbedingte Veränderungen der Anzahl von Immunzellen sowie deren Anteil an der Gesamtzellzahl bei Entnahme der Augen drei Tage nach Laserbehandlung; oben: Immunzellen gesammelt; unten: einzelne Immunzellen [Anteil an Gesamtzellzahl in Promille].....	48
Abbildung 12: Laserbedingte Veränderungen der Anzahl von Immunzellen sowie deren Anteil an der Gesamtzellzahl bei Entnahme der Augen eine Woche nach Laserbehandlung; oben: Immunzellen gesammelt; unten: einzelne Immunzellen [Anteil an Gesamtzellzahl in Promille].....	48
Abbildung 13: Laserbedingte Veränderungen der Anzahl von Immunzellen sowie deren Anteil an der Gesamtzellzahl bei Entnahme der Augen zwei Wochen nach Laserbehandlung; oben: Immunzellen gesammelt; unten: einzelne Immunzellen [Anteil an Gesamtzellzahl in Promille].....	49
Abbildung 14: Zeitverlauf des Medians der absoluten Zellzahl einzelner Immunzellpopulationen in der Choroidea nach Laserbehandlung .....	49
Abbildung 15: Zeitverlauf des Medians des Anteils einzelner Immunzellpopulationen an der Gesamtzellzahl in der Choroidea nach Laserbehandlung [Anteil an Gesamtzellzahl in Promille].....	49
Abbildung 16: Laserbedingte Veränderungen der Anzahl von Immunzellen sowie deren Anteil an der Gesamtzellzahl bei Entnahme der Augen drei Tage nach Laserbehandlung; oben: Immunzellen gesammelt; unten: einzelne Immunzellen [Anteil an Gesamtzellzahl in Promille].....	51
Abbildung 17: Laserbedingte Veränderungen der Anzahl von Immunzellen sowie deren Anteil an der Gesamtzellzahl bei Entnahme der Augen eine Woche nach Laserbehandlung; oben: Immunzellen gesammelt; unten: einzelne Immunzellen [Anteil an Gesamtzellzahl in Promille].....	51
Abbildung 18: Laserbedingte Veränderungen der Anzahl von Immunzellen sowie deren Anteil an der Gesamtzellzahl bei Entnahme der Augen zwei Wochen nach Laserbehandlung; oben: Immunzellen gesammelt; unten: einzelne Immunzellen [Anteil an Gesamtzellzahl in Promille].....	52
Abbildung 19: Zeitverlauf des Medians der absoluten Zellzahl einzelner Immunzellpopulationen in der Retina nach Laserbehandlung .....	52

Abbildung 20: Zeitverlauf des Medians des Anteils einzelner Immunzellpopulationen an der Gesamtzellzahl in der Retina nach Laserbehandlung [Anteil an Gesamtzellzahl in Promille].....	52
Abbildung 21: Veränderung der absoluten Immunzellzahl gelaserter Augen unter Behandlung mit Pioglitazon [oben: Choroidea; unten: Retina; von links nach rechts: 3 Tage, eine Woche, zwei Wochen].....	53
Abbildung 22: Veränderung einzelner Immunzellpopulationen gelaserter Augen unter Behandlung mit Pioglitazon [oben: Choroidea; unten: Retina; von links nach rechts: 3 Tage, eine Woche, zwei Wochen].....	54
Abbildung 23: Veränderung der Verhältnisse der einzelnen Immunzellpopulationen gelaserter Augen zur Gesamtzellzahl unter Behandlung mit Pioglitazon [oben: Choroidea; unten: Retina; von links nach rechts: 3 Tage, eine Woche, zwei Wochen; Anteil an Gesamtzellzahl in Promille].....	54
Abbildung 24: Veränderung der Verhältnisse der einzelnen Immunzellpopulationen gelaserter Augen zum Anteil an der Zahl der Immunzellen unter Behandlung mit Pioglitazon [oben: Choroidea; unten: Retina; von links nach rechts: 3 Tage, eine Woche, zwei Wochen; Anteil an Immunzellzahl in Promille].....	55
Abbildung 25: Zeitverlauf des Medians der absoluten Zellzahl einzelner Immunzellpopulationen in der Choroidea unter Pioglitazon- und Laserbehandlung ...	55
Abbildung 26: Zeitverlauf des Medians des Anteils einzelner Immunzellpopulationen an der Gesamtzellzahl in der Choroidea unter Pioglitazon- und Laserbehandlung [Anteil an Gesamtzellzahl in Promille].....	55
Abbildung 27: Zeitverlauf des Medians der absoluten Zellzahl einzelner Immunzellpopulationen in der Retina unter Pioglitazon- und Laserbehandlung.....	56
Abbildung 28: Zeitverlauf des Medians des Anteils einzelner Immunzellpopulationen an der Gesamtzellzahl in der Retina unter Pioglitazon- und Laserbehandlung [Anteil an Gesamtzellzahl in Promille].....	56
Abbildung 29: Vergleich des Zeitverlaufes des Medians der absoluten Zellzahl neutrophiler Granulozyten in der Choroidea nach Laserbehandlung unter Pioglitazon- gegenüber Cellulosebehandlung .....	56
Abbildung 30: Vergleich des Zeitverlaufes des Anteils neutrophiler Granulozyten an der Gesamtzellzahl in der Choroidea nach Laserbehandlung unter Pioglitazon- gegenüber Cellulosebehandlung [Anteil an Gesamtzellzahl in Promille] .....	56
Abbildung 31: Darstellung der 2 <sup>d</sup> CT-Werte der Voruntersuchungen an ungetrennten Gewebeproben von CX3CR1, IL-6, IL-1 $\beta$ und TNF $\alpha$ <sup>23</sup> [von links oben nach rechts unten] .....	59
Abbildung 32: Darstellung der 2 <sup>d</sup> CT-Werte der Voruntersuchungen an ungetrennten Gewebeproben von MMP-2, MMP-9, IL-10 und VEGF <sup>24</sup> [von links oben nach rechts unten] .....	60
Abbildung 33: Darstellung der Genexpression von CX3CR1, IL-6, IL-1 $\beta$ und TNF $\alpha$ in choroidalem Gewebe <sup>26</sup> [von links oben nach rechts unten].....	61
Abbildung 34: Darstellung der Genexpression von MMP-2, MMP-9, IL-10 und VEGF in choroidalem Gewebe <sup>27</sup> [von links oben nach rechts unten].....	62
Abbildung 35: Darstellung der Genexpression von CX3CR1, IL-6, IL-1 $\beta$ und TNF $\alpha$ in retinalem Gewebe <sup>28</sup> [von links oben nach rechts unten].....	63
Abbildung 36: Darstellung der Genexpression von MMP-2, MMP-9, IL-10 und VEGF in retinalem Gewebe <sup>29</sup> [von links oben nach rechts unten].....	64
Abbildung 37: Nativaufnahme (links) und Autofluoreszenzaufnahme (rechts) eines unbehandelten Augenhintergrundes einer CX3CR1-knock-in Maus.....	66
Abbildung 38: Nativaufnahme (links) und Autofluoreszenzaufnahme (rechts) eines gelaserter Augenhintergrundes einer Cellulose-gefütterter CX3CR1-knock-in Maus (3 Tage nach Laser).....	67

Abbildung 39: Nativaufnahme (links) und Autofluoreszenzaufnahme (rechts) eines gelaserten Augenhintergrundes einer Pioglitazon-gefütterten CX3CR1-knock-in Maus (3 Tage nach Laser) .....	67
Abbildung 40: Laserherdintensität (links) und Peripherieintensität (rechts) 3 Tage nach Laserbehandlung .....	68
Abbildung 41: Laserherdintensität (links) und Peripherieintensität (rechts) eine Woche nach Laserbehandlung .....	69
Abbildung 42: Laserherdintensität (links) und Peripherieintensität (rechts) zwei Wochen nach Laserbehandlung .....	69
Abbildung 43: Autofluoreszenzaufnahmen Cellulosegruppe (links) und Pioglitazongruppe (rechts), sowie Intensitätsquotient 3 Tage nach Laserbehandlung .	70
Abbildung 44: Autofluoreszenzaufnahmen Cellulosegruppe (links) und Pioglitazongruppe (rechts), sowie Intensitätsquotient eine Woche nach Laserbehandlung .....	70
Abbildung 45: Autofluoreszenzaufnahmen Cellulosegruppe (links) und Pioglitazongruppe (rechts), sowie Intensitätsquotient zwei Wochen nach Laserbehandlung .....	71
Abbildung 46: Überblick zu den in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Einflüssen von Pioglitazon auf die Immunzellregulation in einem laserinduzierten CNV-Modell ...	81

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick AMD [16, 35, 62].....	17
Tabelle 2: Einstellung des Thermocycler für die cDNA-Synthese .....	35
Tabelle 3: Zelldifferenzierung Choroidea (adaptiert nach Eter et al. [37]) .....	39
Tabelle 4: Zelldifferenzierung Retina (adaptiert nach Eter et al. [37]) .....	39
Tabelle 5: Gesamtübersicht der Wirkung der Laserbehandlung an murinen Augen auf die Zytokinregulation von Retina und Choroidea .....	65
Tabelle 6: Gesamtübersicht der Wirkung von Pioglitazon an gelaserten murinen Augen auf die Zytokinregulation von Retina und Choroidea .....	65
Tabelle 7: verwendete Chemikalien und Kits .....	II
Tabelle 8: verwendete Medikamente .....	III
Tabelle 9: verwendete Software.....	III

### IV. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AMD	altersabhängige Makuladegeneration
APC	Allophycocyanin
APO-E	Apolipoprotein E
AREDS	Age-Related Eye-Disease-Study
ARMS2	age-related maculopathy susceptibility 2

cDNA	complementary DNA
Cellulose	Methylcellulose
CFH	complement-factor H
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CNV	choroidale Neovaskularisation
DMSO	Dimethylsulfoxid
Epi	Eppendorf Mikroreaktionsgefäß
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	fötale Kälberserum
FSC	forward scatter
G	Fallbeschleunigung [Einheit]
g	Gramm [Einheit]
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde(n) [Einheit]
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
hRez	humane retinale Endothelzellen
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL-10	Interleukin 10
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
IL-6	Interleukin 6
k	„kilo“/tausend [Einheit]
MFI	mean fluorescent intensity
$\mu$ L	Mikroliter [Einheit]
$\mu$ m	Mikrometer [Einheit]
mL	Mililiter [Einheit]
mm	Milimeter [Einheit]
mm <sup>2</sup>	Quadrat-Milimeter [Einheit]

mm <sup>3</sup>	Kubik-Milimeter [Einheit]
MMP-2	Matrix-Metalloproteinase 2
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase 9
msek	Milisekunden [Einheit]
mW	Miliwatt [Einheit]
NaAzid	Natriumazid
nm	Nanometer [Einheit]
OCT	optische Kohärenztomografie
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDT	photodynamische Therapie
PEDF	platelet-derived growth factor
Pen/Strep	Penicillin Streptomycin
Pio	Pioglitazon
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
RPE	retinales Pigmentepithel
rpm	rounds per minute [Einheit]
RPMI	Zellkulturmedium (Roswell Park Memorial Institute)
RT-PCR	real-time polymerase chain-reaction
SCC	side scatter
SLO	Scanning Laser Ophthalmoskop
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
VEGF	vascular endothelial growth factor



## VI. Anhang

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
RNeasy Micro Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
Qia Shredder Columns	Qiagen, Venlo, Niederlande
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Quanti Tect® Primer Assay für SYBR Green	Qiagen, Venlo, Niederlande
Fast Advanced Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
14,3 M $\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Ethanol 99%	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
RPMI	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
DMSO	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Natriumazid	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Fötales Kälberserum: FCS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Mäusefutter: Haltungsdiät	Altromin International, Lage, Deutschland
CD11b Antikörper, APC gelabelt	eBioscience, San Diego, USA
Fc Block: Purified Rat-anti-Mouse, Pharmigen™	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Kalibrationsbeads: CaliBRITE3	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Kollagenase Typ 1A;	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
DNase I	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Carboxymethylcellulose als Natrium Salz	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Medium: VascuLife Basal Medium, LM-0002	Lifeline Cell Technology, Frederick, USA

**Tabelle 7: verwendete Chemikalien und Kits**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Pioglitazon: Actos®	Takeda Pharma GmbH, Osaka, Japan
Isofluran: Forene® 100%	Abott GmbH&Co, AG, Wiesbaden, Deutschland
Ketamin/Xylazin 10%	WDT, Garbsen, Deutschland
Zyklopentolat 0,5%	Bausch und Lomb, Bridgewater, USA

Neosynephrin-POS® 5%	Ursapharm Arzneimittel GmbH, Saarbrücken, Deutschland
Methocel 2%	Omnivision, Puchheim, Deutschland
Propakain-POS® 1%	Ursapharm Arzneimittel GmbH, Saarbrücken, Deutschland

**Tabelle 8: verwendete Medikamente**

BD FACS Diva Software v.6.1.3
Graph Pad Prism: Version 6
IBM® SPSS® Statistics 22
Adobe Photoshop CS5
Image J; 1.48v (Freeware: <a href="http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html">http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html</a> )

**Tabelle 9: verwendete Software**