

**Aus dem Experimental Eye Research Institute
der Augenklinik des Fachbereichs Medizin
der Ruhr-Universität Bochum
Betreuerin: Prof. Dr. Stephanie Joachim**

**Eingereicht über das Institut für Veterinär-Anatomie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Wirkung verschiedener Therapeutika in einer
durch Hypoxie oder oxidativen Stress
geschädigten Organkultur der Schweineretina**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Lisa Hofmann
Tierärztin aus Salzkotten**

**Berlin 2021
Journal-Nr.: 4234**

Aus dem Experimental Eye Research Institute
der Augenklinik des Fachbereichs Medizin
der Ruhr-Universität Bochum
Betreuerin: Prof. Dr. Stephanie Joachim

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Anatomie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Wirkung verschiedener Therapeutika in einer durch Hypoxie oder oxidativen Stress geschädigten Organkultur der Schweineretina

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Lisa Hofmann

Tierärztin aus Salzkotten

Berlin 2021
Journal Nr.: 4234

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Stephanie Joachim
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Corinna Eule

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

pigs, animal model, hypoxia, oxidation, stress, retina, retinopathy, immunohistochemistry, ganglia

Tag der Promotion: 15.12.2021

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-149-0

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2021

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2022 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	V
II. Abbildungsverzeichnis	VII
III. Tabellenverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
2. Literatur	3
2.1. Aufbau des Auges der Haussäugetiere	3
2.2. Histologie der Retina	5
2.2.1. Retinale Ganglienzellen und deren Markierung	8
2.3. Das Glaukom der Haussäugetiere	9
2.3.1. Definition und Klassifizierung	9
2.3.2. Pathogenese und Klinik	11
2.3.3. Diagnose und Therapie	12
2.4. Schweineretina-Organkulturmodell	13
2.5. Modelle zur Untersuchung der Retinadegeneration	15
2.5.1. Modell des oxidativen Stresses	15
2.5.2. Hypoxiemodell	16
2.6. Therapieansätze zur Neuroprotektion	18
2.6.1. iNOS-Inhibitor 1400W	18
2.6.2. Coenzym Q10	18
3. Material und Methoden	21
3.1. Material	21
3.1.1. Antikörper	21
3.1.2. Chemikalien	22
3.1.3. Geräte	23
3.1.4. Lösungen und Puffer	24
3.1.5. Software	25
3.1.6. Verbrauchsmaterialien	25
3.1.7. Verwendetes Labormaterial	27
3.2. Methoden	27
3.2.1. Präparation der Schweineaugen	27
3.2.2. Kultivierung mit Wasserstoffperoxid	29
3.2.3. Kultivierung mit Kobaltchlorid	30

3.2.4. Kultivierung mit dem iNOS-Hemmer 1400W	31
3.2.4.1. Modell des oxidativen Stresses	31
3.2.4.2. Hypoxiemodell	33
3.2.5. Kultivierung mit Coenzym Q10	35
3.2.6. Übersicht über die durchgeführten Studien	36
3.2.7. Kryokonservierung der Retinae	37
3.2.8. Herstellung von retinalen Querschnitten	37
3.2.9. Hämatoxylin-Eosin-Färbung	37
3.2.10. Immunhistochemie	38
3.2.10.1. Immunhistochemie der retinalen Querschnitte	38
3.2.10.2. Immunhistochemie der retinalen Flachpräparate	40
3.2.10.3. Auswertung der Immunhistochemie	41
3.2.10.3.1. Markieren und Schneiden der immunhistochemischen Aufnahmen	41
3.2.10.3.2. Zellzählung mittels ImageJ	41
3.2.10.3.3. Statistische Auswertung	41
4. Ergebnisse	43
4.1. Analysen im Modell des oxidativen Stresses	43
4.1.1. Untersuchung der Wirkung von H ₂ O ₂ auf die retinalen Ganglienzellen	43
4.1.2. Untersuchung der Wirkung des iNOS-Inhibitors im Modell des oxidativen Stresses	44
4.1.2.1. Intakte retinale Schichtung nach vier und acht Tagen Kultivierung	45
4.1.2.2. Untersuchung der Protektion retinaler Neurone vor oxidativem Stress durch den iNOS-Inhibitor	45
4.1.2.3. Kolokalisation des retinalen Ganglienzellmarkers und HIF-1 α	46
4.1.2.4. Untersuchung der Protektion der retinalen Ganglienzellen vor oxidativem Stress durch den iNOS-Inhibitor	47
4.2. Analysen im Hypoxiemodell	49
4.2.1. Untersuchung der Wirkung von CoCl ₂ auf die retinalen Ganglienzellen	49

4.2.2. Untersuchung der Protektion retinaler Neurone durch den iNOS-Inhibitor vor Hypoxie	49
4.2.2.1. Intakte retinale Schichtung nach vier und acht Tagen Kultivierung	49
4.2.2.2. Kolokalisation des retinalen Ganglienzellmarkers und HIF-1 α	50
4.2.3. Untersuchung der Protektion der retinalen Ganglienzellen vor Hypoxie durch den iNOS-Inhibitor	51
4.3. Untersuchung der Protektion retinaler Ganglienzellen durch Coenzym Q10 vor oxidativem Stress	53
4.3.1. Untersuchung der Protektion durch 100 μ M Coenzym Q10	53
4.3.2. Untersuchung der Protektion durch 300 μ M Coenzym Q10	54
5. Diskussion	57
5.1. Degeneration der retinalen Ganglienzellen durch H₂O₂	57
5.2. Kolokalisation von RBPMS und HIF-1α	59
5.3. Schutz vor oxidativem Stress durch den iNOS-Inhibitor 1400W	59
5.3.1. Schutz der retinalen Ganglienzellen nach vier Tagen durch Inhibierung von iNOS	60
5.4. Schutz vor Hypoxie durch den iNOS-Inhibitor 1400W	62
5.4.1. Schutz der retinalen Ganglienzellen nach vier und acht Tagen durch Inhibierung von iNOS	62
5.5. Kein Schutz vor oxidativem Stress durch Coenzym Q10 nach vier Tagen	64
5.5.1. Kein Schutz der retinalen Ganglienzellen durch 100 und 300 μ M Coenzym Q10	65
5.6. Vergleich der untersuchten Therapeutika	67
6. Zusammenfassung	69
7. Summary	71
8. Literaturverzeichnis	73

9. Anhang	81
9.1. iNOS-Inhibitor-Studien	81
9.2. CoQ10-Studien	91
10. Danksagung	95
11. Finanzierungsquellen und Interessenskonflikte	96
12. Publikationen	97
13. Erklärung	98

I. Abkürzungsverzeichnis

A	A	Alexa fluor
B	Brn-3a BSA Bzw.	<i>Brain specific homeobox domain protein 3A</i> <i>Bovines Serum Albumin</i> <i>Beziehungsweise</i>
C	CoCl ₂ CO ₂ CoQ10	Kobaltchlorid Kohlenstoffdioxid Coenzym Q10
D	d.h. DNA	das heißt Desoxyribonukleinsäure
E	eNOS EPO et al.	Endothelial nitric oxide synthase, englisch: endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase Erythropoetin et alii, lateinisch: und andere
F	FP	Flachpräparat
G	GCL	Ganglion cell layer, englisch: Ganglienzellschicht
H	H HE HIF H ₂ O ₂	Hora, lateinisch: Stunde Hämatoxylin-Eosin Hypoxia inducible factor, englisch, Hypoxie induzierender Faktor Wasserstoffperoxid
I	IHC Inh. INL iNOS IOD IOP IPL	Immunhistochemie Inhibitor Inner nuclear layer, englisch: innere nukleäre Schicht inducible nitric oxide synthase, englisch: induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase innerer okulärer Druck inner ocular pressure, englisch: innerer Augenruck inner plexiform layer, englisch: innere plexiforme Schicht
L	LDH	Laktat Dehydrogenase
M	M. µg µl µM mg min. ml mm mm ²	Musculus Mikrogramm Mikroliter Mikromolar Milligramm Minuta, lateinisch: Minute Milliliter Millimeter Quadratmillimeter
N	N. NDS NeuN NFL NGS NO nNOS NOS	Nervus Normal donkey serum, englisch: normales Esel-Serum Neuronal nuclear protein Nerve fiber layer, englisch: Nervenfaserschicht Normal goat serum, englisch: normales Ziegen-Serum Stickstoffmonoxid neuronal nitric oxide synthase, englisch: neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase nitric oxide synthase, englisch: Stickstoffmonoxid-Synthase

O	ONH	Optic nerve head, englisch: Sehnervenkopf, Discus nervi optici
	ONL	Outer nuclear layer, englisch: äußere nukleäre Schicht
	OPL	Outer plexiform layer, englisch: äußere plexiforme Schicht
	O ₂	Sauerstoff
P	PACG	Primary angle closure glaucoma, englisch: primäres Winkelblockglaukom
	PBS	Phosphate buffered saline, englisch: Phosphat gepufferte Salzlösung
	PBST	PBS-Tween
	PFA	Paraformaldehyd
	pH	potentia Hydrogenii
	POAG	primary open angle glaucoma, englisch: primäres Offenwinkelglaukom
PRL	Photoreceptor layer, englisch: Photorezeptorschicht	
Q	qRT-PCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction, englisch: quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion
	QS	Querschnitt
R	RBPMs	<i>RNA binding protein with multiple splicing</i>
	RGC	Retinal ganglion cells, englisch: retinale Ganglienzellen
	RGZ	Retinale Ganglienzellen
	RNS	Reactive nitrogen species, englisch: reaktive Stickstoffspezies
	ROS	Reactive oxygen species, englisch: reaktive Sauerstoffspezies
RPE	Retinal pigment epithelium, englisch: retinales Pigmentepithel	
S	s	Secunda, lateinisch: Sekunde
U	u.a.	unter anderem
	UV	Ultraviolett
V	VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
Z	z.B.	Zum Beispiel
	ZNS	Zentrales Nervensystem
weitere	°C	Grad Celsius
	%	Prozent

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematischer Aufbau des Auges der Haussäugetiere
Abbildung 2	Schematischer Aufbau der Retina
Abbildung 3	HIF-1 α Signalweg, modifiziert nach LaManna et al., 2004
Abbildung 4	Präparation der Schweineaugen
Abbildung 5	Zeitstrahl der Degeneration mit H ₂ O ₂
Abbildung 6	Zeitstrahl der Degeneration mit CoCl ₂
Abbildung 7	Zeitstrahl der Kultivierung mit dem iNOS-Inhibitor 1400W im Modell des oxidativen Stresses
Abbildung 8	Zeitstrahl der Kultivierung mit dem iNOS-Inhibitor 1400W im Hypoxiemodell
Abbildung 9	Zeitstrahl der Kultivierung mit Coenzym Q10 im Modell des oxidativen Stresses
Abbildung 10	Schema der Mikroskopie der retinalen Querschnitte
Abbildung 11	Schema der Mikroskopie der retinalen Flachpräparate
Abbildung 12	Signifikanter Zelluntergang der retinalen Ganglienzellen nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid
Abbildung 13	Unveränderte retinale Schichtung nach vier und acht Tagen Kultivierung
Abbildung 14	Signifikanter Schutz der retinalen Ganglienzellen gegen oxidativen Stress durch den iNOS-Inhibitor 1400W nach vier Tagen
Abbildung 15	Doppelmarkierung von RBPMS und HIF-1 α im Modell des oxidativen Stresses
Abbildung 16	Schutz der retinalen Ganglienzellen vor oxidativem Stress durch den iNOS-Inhibitor
Abbildung 17	Unveränderte retinale Schichtung nach vier und acht Tagen Kultivierung
Abbildung 18	Doppelmarkierung von RBPMS und HIF-1 α im Hypoxiemodell
Abbildung 19	Signifikanter Schutz der retinalen Ganglienzellen gegen Hypoxie durch den iNOS Inhibitor
Abbildung 20	Keine Protektion der retinalen Ganglienzellen vor oxidativem Stress durch 100 μ M CoQ10
Abbildung 21	Keine Protektion der retinalen Ganglienzellen vor oxidativem Stress durch 300 μ M CoQ10

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Darstellung der verwendeten Primärantikörper
Tabelle 2	Darstellung der verwendeten Sekundärantikörper
Tabelle 3	Darstellung der verwendeten Chemikalien
Tabelle 4	Darstellung der verwendeten Geräte
Tabelle 5	Darstellung der verwendeten Lösungen und Puffer
Tabelle 6	Darstellung der verwendeten Software
Tabelle 7	Darstellung der verwendeten Verbrauchsmaterialien
Tabelle 8	Darstellung der verwendeten Labormaterialien
Tabelle 9	Übersicht über die durchgeführten Studien der vorliegenden Dissertation
Tabelle 10	Darstellung der verwendeten Primärantikörper, deren Sekundärantikörper und deren Verdünnung
Tabelle 11	Darstellung der Größe des Schnittfensters der unterschiedlichen Färbungen
Tabelle 12	Mittelwerte der Zellen/mm der iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses, vier Tage, n=6, Anti-NeuN
Tabelle 13	Standardfehler der iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses, vier Tage, n=6, Anti-NeuN
Tabelle 14	p-Werte der iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses, vier Tage, n=6, Anti-NeuN
Tabelle 15	Mittelwerte der RGZ/mm der iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses, vier Tage, n=9-10, Anti-RBPMS
Tabelle 16	Standardfehler der iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses, vier Tage, n=9-10, Anti-RBPMS
Tabelle 17	p-Werte der iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses, vier Tage, n=9-10, Anti-RBPMS
Tabelle 18	Mittelwerte der gezählten RGZ/mm der iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses, acht Tage, n=10, Anti-RBPMS
Tabelle 19	Standardfehler der iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses, acht Tage, n=10, Anti-RBPMS
Tabelle 20	p-Werte der iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses, acht Tage, n=10, Anti-RBPMS
Tabelle 21	Mittelwerte der gezählten RGZ/mm der iNOS-Inhibitorstudie im Hypoxiemodell, vier Tage, n=10, Anti-RBPMS
Tabelle 22	Standardfehler der iNOS-Inhibitorstudie im Hypoxiemodell, vier Tage, n=10, Anti-RBPMS
Tabelle 23	p-Werte der iNOS-Inhibitorstudie im Hypoxiemodell, vier Tage, n=10, Anti-RBPMS

Tabelle 24	Mittelwerte der gezählten RGZ/mm der iNOS-Inhibitorstudie im Hypoxiemodell, acht Tage, n=10, Anti-RBPMS
Tabelle 25	Standardfehler der iNOS-Inhibitorstudie im Hypoxiemodell, acht Tage, n=10, Anti-RBPMS
Tabelle 26	p-Werte der iNOS-Inhibitorstudie im Hypoxiemodell, acht Tage, n=10, Anti-RBPMS
Tabelle 27	Mittelwerte der gezählten RGZ/mm ² der 100 µM CoQ10-Studie im Modell des oxidativen Stresses, vier Tage, n=4-5, Anti-RBPMS
Tabelle 28	Standardfehler der 100 µM CoQ10-Studie im Modell des oxidativen Stresses, vier Tage, n=4-5, Anti-RBPMS
Tabelle 29	p-Werte der 100 µM CoQ10-Studie im Modell des oxidativen Stresses, vier Tage, n=4-5, Anti-RBPMS
Tabelle 30	Mittelwerte der gezählten RGZ/mm ² der 300 µM CoQ10-Studie im Modell des oxidativen Stresses, vier Tage, n=4, Anti-RBPMS
Tabelle 31	Standardfehler der 300 µM CoQ10-Studie im Modell des oxidativen Stresses, vier Tage, n=4, Anti-RBPMS
Tabelle 32	p-Werte der 300 µM CoQ10-Studie im Modell des oxidativen Stresses, vier Tage, n=4, Anti-RBPMS

1. Einleitung

Bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen, wie auch beim Glaukom, sind die genauen Pathomechanismen noch nicht bekannt. Die bisherigen Therapeutika beschränken sich auf die Linderung der Symptome, wie z.B. die Verringerung des Augeninnendrucks. Dabei kommt es aber nicht zu einer ursächlichen Behandlung des Glaukoms, sondern zu einer Verlangsamung des schnellen progressiven Verlaufs der Erkrankung. Daher ist die Erforschung neuer Therapieansätze nötig.

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollen neue Therapieansätze zur Neuroprotektion der Retina erforscht werden.

Sowohl Hypoxie als auch oxidativer Stress spielen in der frühen Pathogenese des Glaukoms eine große Rolle. Diese Mechanismen werden in den beiden etablierten Degenerationsmodellen der Schweineretinaorgankultur unter Verwendung von CoCl_2 oder von H_2O_2 chemisch nachgeahmt. Eine durch CoCl_2 ausgelöste Hypoxie führt zu einer erhöhten Apoptoserate der retinalen Ganglienzellen, wodurch diese anschließend untergehen (Kuehn 2017). Im zweiten Modell wird oxidativer Stress durch H_2O_2 ausgelöst, auch in diesem Modell kann dadurch ein Untergang der retinalen Ganglienzellen herbeigeführt werden (Hurst 2017).

Angelehnt an die oben genannten Modelle sollte in den ersten beiden Protektionsstudien die Wirkung des iNOS-Inhibitors 1400W getestet werden. Hierbei sollte zum einen im Hypoxiemodell versucht werden, die durch den HIF-Signalweg erfolgte Aktivierung von iNOS zu hemmen. Zum anderen sollte im Modell des oxidativen Stresses die Aktivierung von iNOS durch die Mikroglia gehemmt werden. Durch diese Hemmung von iNOS in beiden Modellen sollte untersucht werden, ob eine Protektion der retinalen Ganglienzellen vor der Zytotoxizität von NO, ausgeschüttet von iNOS, hervorgerufen werden kann.

Die bereits erwähnten vorangegangenen Studien in der Arbeitsgruppe bezüglich des iNOS-Inhibitors (10, 100, 200 μM) zeigten noch keine Neuroprotektion (Maliha 2017). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit eine Konzentration von 500 μM untersucht.

In einer weiteren Studie sollte die potentiell protektive Wirkung von CoenzymQ10 im Modell des oxidativen Stresses getestet werden. CoenzymQ10 sollte hier wegen seiner antioxidativen Wirkung eingesetzt werden, um den oxidativen Stress, chemisch ausgelöst durch Wasserstoffperoxid, zu minimieren, oder gar zu hemmen.

Die potentiell neuroprotektiven Wirkungen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Substanzen wurden durch immunhistochemische Markierungen der retinalen Ganglienzellen evaluiert. Dabei wurden die retinalen Ganglienzellen mittels anti-Brn3a, anti-NeuN und anti-RBPMS-Antikörper markiert und anschließend durch eine Zellzählung ausgewertet. Hypoxische Zellen wurden mit dem anti-HIF1 α -Antikörper sichtbar gemacht.

Schlussfolgernd sollte mittels potentieller Neuroprotektiva in dieser Arbeit untersucht werden, ob mit diesen die retinalen Ganglienzellen vor Hypoxie und oxidativem Stress geschützt werden können um somit einen möglichen Ansatz für einen klinischen Einsatz der potentiellen Therapeutika in der Augenheilkunde finden zu können.

2. Literatur

2.1. Aufbau des Auges der Haussäugetiere

Das Auge der Haussäugetiere wird von außen nach innen in drei verschiedene Schichten eingeteilt, die äußere Augenhaut (*Tunica externa/fibrosa bulbi*), die mittlere Augenhaut (*Tunica media/vasculosa bulbi/Uvea*) und die innere Augenhaut (*Tunica interna bulbi/Retina*).

Die Tunica fibrosa bulbi ist eine derbe, gefäßarme Schicht, die sich aus zwei Segmenten zusammensetzt. Aus dem kleineren vorderen Teil, der transparenten Kornea und dem posterior gelegenen Teil, der weißen Augenhaut (*Sklera*). Die Sklera besteht hauptsächlich aus Kollagen- und Elastinfasern, welche ihr eine hohe Widerstandskraft verleihen. Beim Fleischfresser und Menschen befindet sich am Übergang der Sklera zur Kornea eine runde Umrandung, der Limbus corneae, welcher sich bei den anderen Haussäugetieren oval darstellt. Genau an dieser Stelle befindet sich ein Gefäßnetz, welches für den Abfluss des Kammerwassers zuständig ist. Der Rest der Kornea ist frei von Blut- und Lymphgefäßen, jedoch reich an Nervenfasern (Salomon 2020).

Die mittlere Augenhaut wird in drei Abschnitte eingeteilt: Die Aderhaut (*Choroidea*), der Strahlenkörper (*Corpus ciliare*) und die Regenbogenhaut (*Iris*).

Die Choroidea besteht aus einem Netz von Gefäßen und ist funktionell von großer Bedeutung, da dieses Gefäßnetz direkt der Retina aufliegt und sie ernährt. Die Verbindung des Pigmentepithels der Retina mit der Choroidea wird durch die Bruch'sche Membran hergestellt (Stades 2006). In der Choroidea befindet sich bei den meisten Haussäugetieren, jedoch nicht beim Schwein und beim Menschen, ein lichtreflektierender Bereich, das Tapetum lucidum. In diesem Bereich ist das Pigmentepithel der Retina nicht pigmentiert. Die Besonderheit am Tapetum lucidum ist, dass das einfallende Licht durch in ihm eingelagerte Kristalle reflektiert wird und somit die Photorezeptoren ein zweites Mal erregt werden können. Dies ermöglicht ein verbessertes Sehen im Dunkeln (Deeg 2010; Liebich 2012).

Der Strahlenkörper bildet eine Verdickung rund um die Linse, geht vorne in die Iris über und sitzt der Sklera bis an die Ora serrata auf. Dieser ist an der Bildung des Kammerwassers und dessen Abgabe in die hintere Augenkammer beteiligt, welches dann über die Pupille auch in die vordere Augenkammer gelangt. Vom Strahlenkörper aus gehen die Zonulafasern ab, die den Aufhängeapparat der Linse bilden. Zudem setzt am Strahlenkörper der Musculus (M.) ciliaris an, welcher für die Akkommodation der Linse verantwortlich ist (Salomon 2020).

Die Iris schließt sich direkt dem Strahlenkörper an und teilt das Auge in die vordere und hintere Augenkammer. Durch die Iris wird die Pupille gebildet. Eine Verengung (Miosis) oder Erweiterung (Mydriasis) der Pupille entsteht dabei durch die sich in ihr befindlichen M. sphincter pupillae und M. dilatator pupillae. Die Farbe der Iris ist individuell unterschiedlich.

Die innere Augenhaut, die Retina, besteht aus zwei Anteilen: einem blinden Anteil (Pars caeca retinae), welcher direkt hinter der Iris und dem Strahlenkörper liegt und keine Photorezeptoren enthält und einem lichtempfindlichen Teil, der Pars optica retinae. Der lichtempfindliche Anteil der Retina liegt an der Hinterwand des Glaskörpers. Dieser Teil enthält Photorezeptoren. Den Übergang der beiden Retinaanteile ineinander wird Ora serrata genannt (Liebich 2012).

Die Retina stellt einen vorgelagerten Teil des Gehirns dar, mit welchem sie über den Nervus (N.) opticus verbunden ist. Beide Teile der Retina bestehen aus einem Außen- und einem Innenblatt, welche bei der Pars optica retinae deutlicher ausgeprägt sind. Die beiden Blätter sind das einschichtige, äußere Pigmentepithel und das mehrschichtige, innen liegende Stratum nervosum. Beide Schichten sind nur an zwei Punkten fest fixiert, im Bereich der Ora serrata und im Bereich des Nervenkopfes des N. opticus, was klinisch von Bedeutung ist. Durch große Mengen an Melanineinlagerungen erhält das Pigmentepithel seine dunkle Färbung. Dieses Epithel ist unter anderem (u.a.) für die Blut-Retina-Schranke verantwortlich. Der Sehnerv entspringt zentral in der Mitte der Retina und bildet hier die Sehscheibe oder den blinden Fleck, an dieser Stelle befinden sich keine Rezeptorzellen (Salomon 2020). Über diesem Bereich befindet sich bei Pferd, Schwein und Wiederkäuer die Area centralis striaeformis, welche sich als heller Streifen darstellt. Diese dient dem monokulären Sehen und ist durch ein erhöhtes Aufkommen von Zapfen und Nervenzellen des 1. und 2. Neurons gekennzeichnet (Liebich 2012; Beltran 2017). Einige Millimeter temporal vom blinden Fleck entfernt, liegt die Area centralis retinae, die Stelle des schärfsten Sehens (Liebich 2012).

Die vordere und hintere Augenkammer stehen über die Pupille miteinander in Kontakt und sind beide mit Kammerwasser gefüllt. Im Augeninneren befinden sich zudem noch der Glaskörper und die Linse.

Nachdem das Licht die Kornea passiert hat, durchbricht es die vordere Augenkammer. Diese wird nach anterior von der Kornea und nach posterior von der Vorderfläche der Iris begrenzt. Der in ihr befindliche Iridocornealwinkel ist für den Kammerwasserabfluss und somit für die Regulation des Augeninnendrucks von großer Bedeutung. Die hintere Augenkammer wird von der Hinterfläche der Iris, dem Corpus ciliare, den Zonulafasern, der Vorderfläche der Linse und der Vorderfläche des Glaskörpers umschlossen. Hier wird, wie oben bereits erwähnt, das Kammerwasser vom Ziliarepithel gebildet. Die Verbindung der vorderen und hinteren Augenkammer stellt die Pupille dar. Weiter posterior befindet sich der Glaskörperraum, welcher zwischen der Hinterfläche der Linse, dem hinteren Teil des Corpus ciliare, den Zonulafasern und der Retina liegt und vollständig vom Glaskörper ausgefüllt wird. Der Glaskörper (Corpus vitreum) besteht aus einer gallertigen, wässrigen Masse und wird durch die Linse im vorderen Bereich eingedellt. Die Funktion des Glaskörpers besteht vor

allem darin, den Metabolismus der Retina und den intraokulären Druck zu steuern. Außerdem ist er an der Brechung des einfallenden Lichtes beteiligt.

Die Linse ist transparent und steht durch die Zonulafasern mit dem Ziliarkörper in Kontakt. Die Linsenkapsel ist äußerst dehnungsfähig, was für die Akkommodation der Linse von großer Bedeutung ist. Im Inneren der Linse befinden sich die regelmäßig angeordneten Linsenfasern. Jede Änderung des Metabolismus oder der Anordnung dieser Fasern kann zur Trübung der Linse (= grauer Star) führen (Salomon 2020) (Abbildung 1).

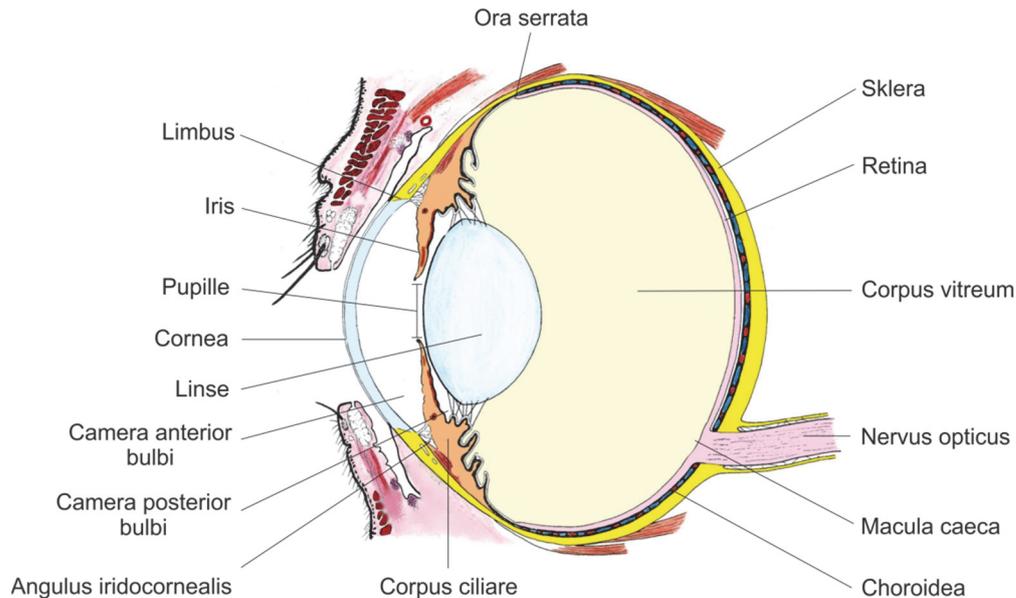


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Auges der Haussäugetiere.

Am Auge werden drei Schichten unterschieden, die äußere Augenhaut, die mittlere Augenhaut und die innere Augenhaut (Retina). Die äußere Augenhaut besteht aus zwei Anteilen, der Sklera und der transparenten Cornea. Den Übergang der beiden Anteile ineinander nennt man Limbus corneae. Bei der mittleren Augenhaut unterscheidet man Choroidea, Corpus ciliare und Iris. Das Corpus ciliare liegt auf der Sklera und verläuft auf dieser nach anterior bis zur Iris und nach posterior bis zur Ora serrata. Zudem bildet das Corpus ciliare über die Zonulafasern den Aufhängeapparat der Linse. Die Iris bildet die Pupille. Das Augeninnere wird in die vordere (Camera anterior bulbi) und hintere Augenkammer (Camera posterior bulbi), sowie den Glaskörperraum eingeteilt. In der vorderen Augenkammer befindet sich der für den Kammerwasserabfluss wichtige Iridocornealwinkel (Angulus iridocornealis). Die hintere Augenkammer wird begrenzt von der Hinterfläche der Iris, der Vorderfläche der Linse, dem Corpus ciliare und der Vorderfläche des Glaskörpers. Der Glaskörper befindet sich im weiter posterior gelegenen Glaskörperraum (modifizierte Abbildung nach F.-V. Salomon, 2020).

2.2. Histologie der Retina

Die Aufgabe der Retina besteht darin, die elektromagnetische Energie des Lichtes in elektrochemische Energie umzuwandeln und anschließend an das Gehirn weiterzuleiten. Dazu muss der Reiz zunächst die gesamte Retina passieren. Ausgehend von den

Photorezeptorzellen wird das Signal über die Amakrin- und Bipolarzellen bis hin zu den Ganglienzellen geleitet. Nach Erreichen der retinalen Ganglienzellen wird das Signal über deren Axone, vereinigt zum N. opticus, zum Gehirn weitergeleitet, um dort weiter verarbeitet zu werden (Deeg 2010).

Die Retina besteht aus zwei Teilen, der Pars caeca und der Pars optica. Der lichtunempfindliche Teil liegt im vorderen Augenabschnitt und geht an der Ora serrata in den lichtempfindlichen Teil über. Die Pars optica besteht aus zwei Blättern, dem Stratum nervosum und dem Stratum pigmentosum (Ulfig 2005).

Das Stratum pigmentosum, oder Pigmentepithel, liegt zwischen der Bruch'schen Membran, der Aderhaut und der Photorezeptorschicht des inneren Blattes der Retina. Dieses ist im Bereich der Ora serrata und des Discus nervi optici fest mit dem Stratum nervosum verbunden (Liebich 2012). Die Aufgabe des Pigmentepithels besteht darin, das einfallende Licht zu absorbieren, Melanin zu synthetisieren, Rhodopsin zu erneuern, Vitamin A zu speichern, den Metabolismus der Stäbchen und Zapfen zu steuern, sowie Stoffwechselprodukte zu transportieren (Salomon 2020).

Das Stratum nervosum stellt einen vorgelagerten Teil des Gehirns dar, dessen Verbindung der N. opticus ist. Der Lichtreiz wird hier von drei hintereinander geschalteten Neuronen, Photorezeptoren, bipolaren Nervenzellen, Ganglienzellen und den Interneuronen verarbeitet. Als Interneurone fungieren Horizontal- und Amakrinzellen. Zusätzlich enthält die Retina noch Gliazellen, die sog. Müller-Zellen, welche die komplette Retina durchziehen und für den Zusammenhalt der Schichten sorgen. Die Retina besteht insgesamt aus neun Schichten, wobei zwischen zellkernhaltigen und zellkernarmen Schichten unterschieden wird (Abbildung 2).

Die äußerste Schicht bildet die Photorezeptorschicht (PRL), welche aus zwei Typen von Photorezeptoren, den Stäbchen und Zapfen, besteht. Die Stäbchen sind für das Erkennen von Helligkeitsunterschieden verantwortlich, wobei die Zapfen das Erkennen von Farben ermöglichen. Als nächstes folgt die äußere Gliagrenzschicht. Diese stellt die Verbindungen zwischen den Photorezeptorzellen und den Müller-Zellfortsätzen dar. In der äußeren Körnerschicht befinden sich die Zellkörper der Photorezeptorzellen. Die äußere plexiforme Schicht stellt eine Schicht aus Synapsen zwischen den Fortsätzen der Photorezeptoren und den Fortsätzen der Bipolar- und Horizontalzellen dar. Die Zellkörper der Bipolarzellen befinden sich in der inneren Körnerschicht, wo sich auch im Randbereich die Zellkörper der Horizontal- und Amakrinzellen befinden. Die innere plexiforme Schicht besteht aus Synapsen zwischen den Fortsätzen der Bipolar- und Amakrinzellen und denen der retinalen Ganglienzellen (RGZ). Die Perikaryen der retinalen Ganglienzellen befinden sich in der nachfolgenden Ganglienzellschicht. In der Nervenfaserschicht sind die Axone der

Ganglienzellen enthalten. Es folgt die innere Gliagrenzschicht, welche die Enden der Müllerzellfortsätze und die Basallamina enthält (Ulfig 2005).

Ferner werden noch zwei wichtige Gebiete in der Retina unterschieden. Zum einen die Area centralis retinae, die Stelle des schärfsten Sehens. Beim Menschen wird dieser Bereich Fovea centralis retinae genannt, welche wegen ihrer gelblichen Färbung auch Makula lutea heißt. Diese gelbe Pigmentierung fehlt den Haussäugetieren (Liebich 2012). Somit fehlt dem Schwein eine mit dem Menschen vergleichbare Makula, jedoch befindet sich auch beim Schwein am visuellen Streifen an der Area centralis retinae eine erhöhte Zapfendichte (Chandler 1999). An dieser Stelle können die Zapfen 1:1 mit den Ganglienzellen verschaltet werden (Ulfig 2005; Liebich 2012). Die Häufigkeit der Zapfen nimmt mit Entfernung zur Makula ab.

Als zweite wichtige Stelle ist der blinde Fleck, oder Discus nervi optici zu nennen, welcher eine rundliche Struktur besitzt und keine Rezeptorzellen enthält. An dieser Stelle laufen die Axone der Ganglienzellen zum N. opticus zusammen, welche nach Durchtritt durch die Sklera mit einer Myelinscheide umgeben werden (Ulfig 2005).

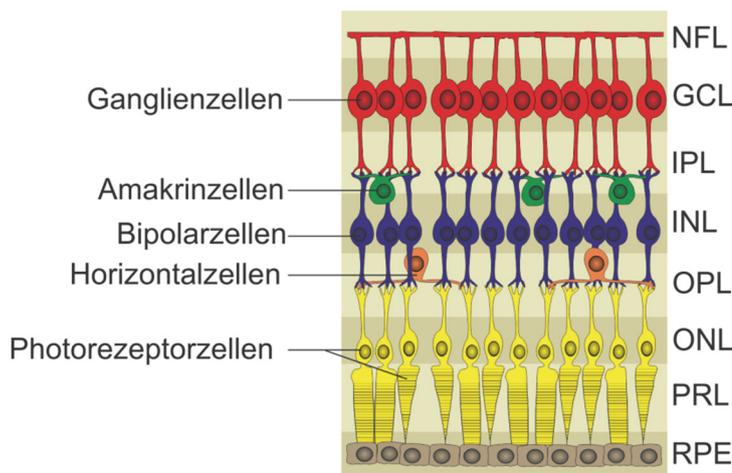


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Retina

Nachdem ein Lichtreiz das RPE durchdrungen hat, wird der Reiz durch die Photorezeptoren aufgenommen. Die Zellkörper der Photorezeptorzellen liegen in der äußeren Körnerschicht (ONL), wohingegen das Signal in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) an die Bipolar- und Amakrinzellen weitergegeben wird. In der inneren Körnerschicht (INL) liegen die Zellkörper der Bipolarzellen, welche dann über weitere Synapsenverbindungen das Signal an die Amakrin- und Ganglienzellen weitergeben. Diese Verschaltung findet in der inneren plexiformen Schicht (IPL) statt. Die Zellkörper der retinalen Ganglienzellen befinden sich in der Ganglienzellschicht (GCL). Von dort aus gelangt das Signal über die Axone der retinalen Ganglienzellen, welche in der Nervenfaserschicht (NFL) zusammenlaufen, und schließlich den N. opticus bilden, zum Gehirn.

NFL= Nervenfaserschicht; GCL= Ganglienzellschicht; IPL= innere plexiforme Schicht; INL= innere Körnerschicht; OPL= äußere plexiforme Schicht; ONL= äußere Körnerschicht; PRL= Photorezeptor

Schicht, RPE= retinales Pigmentepithel (modifizierte Abbildung nach Welsch, U., Lehrbuch Histologie (2006), Kapitel 17.2, Sehorgan, Abb.17-26: Neuronale Elemente der Retina).

2.2.1. Retinale Ganglienzellen und deren Markierung

Die retinale Ganglienzelle ist als Zelle definiert, deren Axon einen Anteil des N. opticus bildet. Die Gesamtheit der Axone aller retinalen Ganglienzellen bilden somit, vereinigt zum N. opticus, die Verbindung vom Auge zum Gehirn (Hughes 1975). Retinale Ganglienzellen besitzen viele morphologische und funktionelle Unterschiede. Bis heute wurden ungefähr 20 Ganglienzellpopulationen nachgewiesen, wobei jede Population noch Subpopulationen aufweist (Roska 2014). Morphologisch gemeinsam haben sie jedoch einen großen hellen Zellkern und ein organellenreiches Zytoplasma (Welsch 2006). Zusätzlich verzweigen sich ihre Dendriten in der inneren plexiformen Schicht, sie setzen Glutamat als Neurotransmitter frei und die Zellkörper befinden sich in der Ganglienzellschicht (Sanes 2015).

Ein molekularer Nachweis der retinalen Ganglienzellen ist u.a. durch die in dieser Arbeit verwendeten Marker Brn-3a (Brain-specific homeobox domain protein 3A) und RBPMS (RNA binding Protein with multiple splicing) möglich. NeuN (Neuronal nuclear protein) kann als nicht spezifischer Ganglienzellmarker eingesetzt werden.

Brn-3a ist ein Transkriptionsfaktor der POU4-Klasse und wird sowohl in sensorischen Neuronen der Retina, als auch im zentralen Nervensystem exprimiert (Fedtsova 1995). Transkriptionsfaktoren der POU-4-Klasse sind durch das Vorhandensein einer DNA-bindenden POU-Domäne gekennzeichnet und spielen eine wichtige Rolle in der neuronalen Differenzierung, dem Überleben und der Entwicklung der Zellen des zentralen und des peripheren Nervensystems (Zou 2012). Da es sich um einen Transkriptionsfaktor handelt, stellt sich Brn-3a nach immunhistochemischer Färbung nur im Nukleus dar (Nadal-Nicolas 2009). Da Brn-3a somit auch in den retinalen Ganglienzellen exprimiert wird, gilt dieser als spezifischer Ganglienzellmarker (Xiang 1995). In dieser Arbeit wurde zunächst der Marker Anti-Brn-3a aus der Ziege verwendet. Da die Produktion dieses Markers der Firma Santa-Cruz Biotechnology jedoch eingestellt wurde und der Marker Anti-Brn3a aus der Maus nicht mit den Zellen der Schweineretina interagiert, wurde bis zur Etablierung des Markers RBPMS auf der Schweineretina der unspezifische Ganglienzellmarker NeuN verwendet. NeuN ist ein Protein, welches im Zellkern und Zytoplasma der meisten Neurone im zentralen Nervensystem lokalisiert ist (Gusel'nikova 2015).

RBPMS ist das „RNA-binding protein with multiple splicing“ und gilt als spezifischer Ganglienzellmarker, der außer retinalen Ganglienzellen nur noch Zellen des Herzens, der Niere, der Leber und Lunge anfärbt. RBPMS-Gene sind u.a. an der Regulation der Genexpression, an der posttranskriptionellen Modifizierung und an der Regulierung der

Translation beteiligt. Bei einer immunhistochemischen Färbung stellt sich RBPMS also sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma dar (Kwong 2010).

2.3. Das Glaukom bei Hund und Katze

2.3.1. Definition und Klassifizierung

Das Glaukom ist eine heterogene Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen, welche zur Exkavation und Atrophie des Discus nervi optici, sowie zum Verlust retinaler Ganglienzellen führen und somit zu einem progressiven Visusverlust führt (Flanagan 1998).

Beim Menschen ist das Glaukom eine der häufigsten Ursachen für irreversible Erblindung weltweit, hier beträgt die globale Prävalenz bei einem Alter von 40-80 Jahren 3,45 % (Tham 2014). Dies trifft auch für die Haussäugetiere zu (Ofri 2007). Bei diesen kommt das Glaukom vor allem bei Klein- und Heimtieren vor, hier insbesondere beim Hund und seltener bei der Katze (Schmidt 2020).

Aufgrund des multifaktoriellen Geschehens dieser Erkrankung ist eine exakte Klassifizierung schwer. Sowohl die mögliche Ursache als auch die gonioskopische Beschaffenheit des Iridocornealwinkels und das Stadium der Erkrankung können zur Klassifizierung des Glaukoms herangezogen werden (Pizzirani 2015).

Bei der ursächlichen Einteilung werden das primäre und das sekundäre Glaukom unterschieden. Das primäre Glaukom ist als Erkrankung gekennzeichnet, bei dem keine gleichzeitigen oder vorangegangenen Augenerkrankungen vorliegen und das Glaukom somit spontan aus unbekanntem intrinsischen Gründen entsteht (Pizzirani 2015; Nell 2017). Zudem sind beim primären Glaukom immer beide Augen betroffen, obwohl diese nicht zum gleichen Zeitpunkt betroffen sein müssen. Zwischen der Diagnose des Glaukoms in beiden Augen können Monate bis Jahre liegen (McLellan 2011; Pizzirani 2015).

Beim primären Glaukom kann es sich um ein congenitales Glaukom, ein Winkelblockglaukom oder ein Offenwinkelglaukom handeln. Beim congenitalen Glaukom kommt es zu einer schweren Form des Glaukoms, welches bei der Katze von Geburt an besteht oder aber erst im mittleren oder fortgeschrittenen Alter der Katze zu klinischen Symptomen führt (McLellan 2011). Beim Hund treten klinische Symptome in der Regel direkt nach der Geburt oder in den ersten Lebensmonaten auf (Pizzirani 2015).

Die Klassifizierung zwischen Offenwinkelglaukom oder Winkelblockglaukom geschieht anhand der Beschaffenheit des Iridocornealwinkels (Nell 2017). Der Iridocornealwinkel befindet sich in der vorderen Augenkammer und grenzt sich von dieser durch ein bindegewebiges Trabekelwerk zwischen Margo ciliaris der Iris und dem peripheren Anteil der Kornea ab. Dieser Winkel ist für den Kammerwasserabfluss und die Regulation des Augeninnendrucks essentiell (Salomon 2020).

Das Offenwinkelglaukom wird bei normal weitem Kammerwinkel Weitwinkelglaukom, bei einem zu engen Kammerwinkel Engwinkelglaukom genannt (Nell 2017). Grundsätzlich ist beim Offenwinkelglaukom der Winkel zwischen der Iris und der Kornea, also die Stelle an der das Trabekelwerk das Kammerwasser filtert, offen (Gupta 2016). Beim Menschen ist das Offenwinkelglaukom die häufigste Glaukomform und kommt in Europa und den USA bis zu sieben Mal häufiger vor als das Winkelblockglaukom (Quigley 2006). Ebenso ist das Offenwinkelglaukom die häufigste Primärglaukom-Erkrankung bei der Katze, obwohl bei dieser ein Primärglaukom grundsätzlich nur sporadisch vorkommt (McLellan 2011; Pizzirani 2015). Hunde sind im frühen Stadium des Offenwinkelglaukom meist gonioskopisch normal, wobei sich im Verlauf der Zeit der Kammerwinkel durch zu hohen intraokulären Druck (IOD) immer mehr schließt (Pizzirani 2015).

Das Winkelblockglaukom kommt vor allem beim Hund vor und ist gekennzeichnet durch den Zusammenbruch des Kammerwinkels und der Ziliarspalte, wodurch es zu einer Obstruktion des Abflusses des Kammerwassers kommen kann (Ahram 2014). Beim Hund wird eine genetische Disposition vermutet, wobei Cocker Spaniel und Bassets vermehrt betroffen sind (Gelatt 2004).

Ein Primärglaukom ohne morphologische Veränderungen im Kammerwinkel ist bei Beagles unter Laborbedingungen bekannt (Schmidt 2020). Beim Menschen kommt es allerdings bei bis zu 30% der Patienten zu einem sog. Normal- oder früher Niederdruckglaukom (Song 2014). Ob ein Normaldruckglaukom auch bei Hunden vorkommt, ist bisher noch nicht geklärt (Trick 1993; Komaromy 1998; Ofri 2007). Eine Besonderheit bildet jedoch die Katze. Bei dieser ist beim Offenwinkelglaukom der IOD meist nur moderat erhöht oder fluktuierend, was die klinische Diagnose erschwert. Es kommt zu einem verringerten Pupillarreflex und einer Dilatation der Pupille resultierend aus dem Verlust retinaler Ganglienzellen und dem Schaden des N. opticus (McLellan 2011).

Das sekundäre Glaukom entsteht im Anschluss an andere okuläre oder systemische Erkrankungen. Hierbei kommt es zu einer Obstruktion des Kammerwasserabflusses durch einen oder mehrere Mechanismen. Eine Verlagerung von benachbarten Strukturen oder ein direkter Verschluss des Iridocornealwinkels bzw. der Pupille sind möglich. An der Pupille kann beispielsweise sowohl die Linse als auch der Glaskörper, sowie Neoplasien und Entzündungen für einen Verschluss sorgen. Auch der Kammerwinkel kann durch ebensolche Veränderungen verschlossen werden. (Pumphrey 2015). Auf Grund dessen kann sich das sekundäre Glaukom sowohl nur in einem als auch bei systemischen Prozessen in beiden Augen manifestieren. Bei der Katze ist dieses die häufigste Form eines Glaukoms, meist ausgelöst durch eine Neoplasie oder eine Uveitis am betreffenden Auge. Andere Ursachen können ein Trauma, intraokuläre Blutungen oder eine Linsenluxation sein. Eine Linsenluxation ist allerdings bei der Katze eher selten und vermehrt beim Hund anzutreffen

(McLellan 2011). Bei der Katze ist zusätzlich noch das selten vorkommende maligne Glaukom zu nennen, bei dem es vermutlich durch Anomalien im vorderen Glaskörper zu einer wässrigen Akkumulation in diesem kommt. Folglich kommt es zu einer vermehrten Ausdehnung des Glaskörpers, wodurch die Linse und die Iris verlagert werden können. Die Ziliarspalte kollabiert und der IOD steigt (Esson 2015). Beim Hund sind als Ursachen für das sekundäre Glaukom Uveitis, Linsenluxation, Katarakt, Kataraktoperationen, retinale Ablösung und Neoplasie zu nennen (Pumphrey 2015).

2.3.2. Pathogenese und Klinik

Die Pathogenese des Glaukoms ist multifaktoriell und noch nicht vollständig erforscht (Agarwal 2009). Eine Rolle spielen vor allem der erhöhte intraokuläre Druck, das Alter, genetische Faktoren, Umweltfaktoren und vaskuläre und immunologische Faktoren. Das Endstadium des Glaukoms ist die glaukomatöse Optikusneuropathie, welche durch die Apoptose der retinalen Ganglienzellen, Gliazell-Aktivierung, Gewebsumbildung und Veränderungen im Blutfluss charakterisiert ist (Pizzirani 2015). Für die Entstehung von glaukomatösen Schäden gibt es unterschiedliche Theorien.

Die mechanische Theorie geht davon aus, dass durch den erhöhten IOD die Lamina cribrosa der Sklera so gedehnt wird, dass deren Poren, durch die die Axone der retinalen Ganglienzellen zum N. opticus zusammen laufen, so verändert werden, dass es zu einer irreparablen Schädigung der Axone kommt (Yan 1994). Zudem werden bei Druckänderungen die Mechanorezeptoren der ruhenden Astrozyten erregt, wodurch diese in ihre aktivierte Form überführt werden, was zu einer Gliose führt (Brooks 1999). In einem anderen Erklärungsansatz der mechanischen Theorie führt ein erhöhter IOD zu einem Druck auf okuläre Blutgefäße, wodurch die Perfusion des okulären Gewebes beeinträchtigt wird.

Die vaskuläre Hypothese geht von einer primären Ischämie und somit Hypoxie des Gewebes aus. Durch die Ischämie und die sich anschließenden Reperfusionsschäden kommt es in Folge zu einer Gewebsumbildung, welche ihrerseits den Abfluss des Kammerwassers behindert (Flammer 2002).

Sowohl die Mechanismen der vaskulären, als auch die der mechanischen Theorie können zu einem Schaden der retinalen Ganglienzellen führen. Finale Auslöser für diesen Zelluntergang können sowohl oxidativer Stress, als auch mitochondriale Dysfunktion, Gliazell-Aktivierung, Gewebsumbildung, Glutamat-Exzitotoxizität, immun-vermittelte Mechanismen und Entzug von Neurotrophinen sein (Pizzirani 2015).

Die mitochondriale Dysfunktion entsteht u.a. dadurch, dass die Mitochondrien bei zunehmendem Alter nicht mehr komplett in der Lage sind, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) abzubauen. Somit kommt es bei gesteigertem Alter zu einem Ungleichgewicht in der Redox-Kette. Gerade Neuronen sind betroffen, da diese eine sehr hohe metabolische Rate

aufweisen und daher besonders viele Mitochondrien zur Generierung von ATP besitzen. Bei der Energiegewinnung kommt es auch unter physiologischen Umständen zur Bildung von ROS, welche unter anderem wichtig für Signalkaskaden sind. Kommt es jedoch zu einem Ungleichgewicht in der Redox-Kette, kann dies zu einem hohen Verlust von Neuronen führen. ROS akkumulieren, was wiederum zu oxidativem Stress führt. Im physiologischen Zustand hat jede Zelle genügend Antioxidantien um dem oxidativen Stress zu entgehen. Im fortgeschrittenen Alter nimmt diese Kapazität ab, dadurch fallen vermehrt reaktive Sauerstoffspezies und reaktive Stickstoff Spezies an. Diese führen zu Schäden an mitochondrialen und zellulären Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren der Zelle und zu inflammatorischen Prozessen (Cui 2012).

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiger Vertreter der RNS. Bei hohen Konzentrationen von NO kommt es zu Zell- und Gewebeschäden. Zusätzlich wird Endothelin-1 aus Gliazellen freigesetzt, welches zu einer vasospastisch bedingten Hypoxie führt (Haefliger 1999; Kallberg 2002). Beide Moleküle, NO und Endothelin-1, wurden bei Hunden mit einem Winkelblockglaukom nachgewiesen (Kallberg 2002; Pizzirani 2015).

Klinisch äußert sich das Glaukom vor allem (v.a.) in der sog. Glaukom-Trias. Hier kommt es zu einem geröteten Auge, weiter Pupille und erhöhtem IOD (Nell 2017). Bei der Katze kann es aufgrund ihrer dünneren Sklera bei einem hohen IOD zu einem Buphthalmus mit dadurch verbundener Verminderung des Lidschlusses und deren Folgen kommen. Im Vergleich zum Hund ist das Auge der Katze jedoch nicht so anfällig für glaukomatöse Schäden. Auch ein korneales Ödem, verminderte Reflektion des Tapetum lucidum und Verminderung der Dicke der Retina tritt nicht so oft auf wie beim Hund. Eine weitere Besonderheit ist, dass der feline Discus nervi optici selbst bei der gesunden Katzen leicht eingedellt erscheint (McLellan 2011). Weitere klinische Symptome beim Hund sind z.B. Lichtscheue, Lakrimation, Apathie, Hyperämie der konjunktivalen und ziliären Gefäße, Korneaödem, getrübbtes Kammerwasser, druckbedingte Irisatrophie, verzögerter bis unvollständiger Pupillarreflex, Subluxation oder Luxation der Linse und final Netzhautatrophie und Exkavation des N. opticus bis zum vollständigen Visusverlust (Nell 2017; Schmidt 2020).

2.3.3. Diagnose und Therapie

Die Diagnose erfolgt anhand der oben genannten klinischen Anzeichen und der nachfolgend beschriebenen Methoden. Am besten eignet sich eine Gonioskopie, also die Untersuchung des Kammerwinkels (Nell 2017). Aufgrund der oft schon weit klinisch fortgeschrittenen Symptome des zuerst betroffenen Auges, ist dieses meist schwer zu untersuchen. Daher sollte zur Untersuchung das gesund erscheinende Auge mit herangezogen werden (Pizzirani 2015). Auch eine Tonometrie sollte durchgeführt werden (Nell 2017). Wichtig ist hierbei zu wissen, dass beim Katzenauge Fluktuationen des IOD vorkommen können. Dies ist von

mehreren Faktoren abhängig, hierzu zählen Stress bedingter erhöhter IOD und höherer IOD während des Östrus der Katze. Darüber hinaus haben sehr junge und alte Katzen einen deutlich geringeren IOD (McLellan 2011).

Falls eine Therapie des mit einem Primärglaukom betroffenen Auges eines Haussäugetieres noch sinnvoll erscheint und nicht bereits eine Enukleation in Betracht gezogen wird, sollte zunächst die Senkung des Augeninnendrucks im Vordergrund stehen. Dies kann durch die medikamentöse Verbesserung des Kammerwasserabflusses geschehen. Hierfür eignen sich Miotika, Adrenergika, Prostaglandine und Prostaglandin-Synthase-Hemmer. Des Weiteren ist es möglich über Carboanhydrasehemmer oder α_2 -Agonisten die Kammerwasserproduktion zu hemmen. Außerdem ist eine Osmotherapie und bei zusätzlicher Entzündung eine Entzündungshemmung möglich. Diese medikamentösen Therapieansätze sind in der Regel allerdings nicht zur dauerhaften Druckregulierung geeignet. Daher sollte, solange der Visus des betroffenen Auges noch erhalten ist, eine Operation in Betracht gezogen werden. Als einzige visuserhaltende Operation wird die transsklerale Destruktion des Ziliarkörpers angesehen. Alle anderen Methoden führen durch Vernarbungen und Entzündungen nur zu vorübergehender Besserung. Bei blinden Augen sollte aus ethischer Sicht eine Enukleation vorgenommen werden. Beim Sekundärglaukom richtet sich die Therapie nach der Grunderkrankung, liegt z.B. eine Linsenluxation mit anschließendem Sekundärglaukom vor, sollte zunächst eine Linsenextraktion durchgeführt werden (Nell 2017).

Da jedoch bei vielen Patienten der Sehverlust trotz Kontrolle des intraokulären Drucks fortschreitet, sollten die genauen molekularen Mechanismen weiter erforscht werden, um schließlich Therapien entwickeln zu können, die direkt die betroffenen retinalen Ganglienzellen schützen (Grozdanic 2010).

2.4. Schweineretina-Organkulturmodell

Es gibt verschiedene Modelle zur Untersuchung der Retinadegeneration, eines davon ist die in dieser Arbeit verwendete Organkultur. Diese bietet eine gute Alternative zu den anderen beiden üblichen Modellen, dem Tierversuch und der Zellkultur.

Bisher werden zur Erforschung retinaler Degeneration meist Tiermodelle eingesetzt. Hierfür eignen sich besonders gut Nager, wie Ratten und Mäuse, u.a. wegen ihrer hohen Reproduzierbarkeit. Die verwendeten Tiere stammen aus Inzuchtlinien, wodurch diese ein sehr ähnliches Genom aufweisen. Daher haben alle Tiere ähnliche Voraussetzungen für die Versuche. Ein großer Nachteil ist jedoch, dass das Nager-Auge dem menschlichen Auge zwar im Aufbau ähnelt, es jedoch auch wichtige Unterschiede gibt. Zum einen besitzen Nager einen sehr kleinen Glaskörper, hier gibt die große Linse dem Auge Stabilität (Skeie 2011). Zum anderen ist das Nagerauge verglichen mit dem menschlichen Auge sehr klein.

Vorteil des Tiermodells ist, dass die Versuche *in vivo* stattfinden und daher die Effekte der Neurodegeneration im gesamten Tier untersucht werden können.

Bei einer Organkultur werden Teile oder gesamte Organe eines getöteten Tieres entnommen und *in vitro* kultiviert (Gstraunthaler 2013). Die in dieser Arbeit verwendeten Schweineaugen sind dem menschlichen Auge deutlich ähnlicher. Beispielsweise entspricht die Größe des Auges in etwa der des menschlichen Auges, was ebenso einen großen Glaskörper bedingt. Darüber hinaus besitzt das Schwein zwar keine echte Makula, aber eine Area centralis retinae (visueller Streifen), an der die Zapfen-Dichte deutlich erhöht ist (Chandler 1999; Hendrickson 2002).

In einer Organkultur wird ein Stück der Retina im gesamten Zellverbund entnommen, was zwar einen klaren Vorteil gegenüber der Zellkultur darstellt, jedoch auch zu Degenerationsmechanismen in der entnommenen Probe führt. Ein weiterer Nachteil ist, dass eine optimale Versorgung der Retina durch Abtrennung des Sehnervs und von dem Pigmentepithel nicht gewährleistet werden kann. Auch ist die Kultivierungsdauer begrenzt (Bell 2016; Kuehn 2016). Diese ist jedoch ausreichend, um neurodegenerative Effekte wie z.B. die durch Kobaltchlorid (CoCl_2) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2) untersuchen zu können. Sowohl die Kultivierung mit CoCl_2 , als auch mit H_2O_2 sind etablierte Neurodegenerationsmodelle der Schweineretina-Organokultur (Hurst 2017; Kuehn 2017). Darüber hinaus müssen für die Organokultur der Schweineretina keine Tiere gezüchtet, gehalten und im Anschluss an die Versuche euthanasiert werden. Die Schweineaugen werden nämlich als Nebenprodukt vom Schlachthof bezogen. Somit sind die Versuche mit Schweineaugen gut reproduzierbar und kostengünstig. Darüber hinaus werden schmerzhaftes Behandlungen der Tiere, wie bei *in vivo* Versuchen vermieden (Kuehn 2016).

Ein weiteres Modell zur Untersuchung der Retinadegeneration ist die bereits erwähnte Zellkultur. Unterschieden werden die primäre und die sekundäre Zellkultur.

Bei der primären Zellkultur handelt es sich um eine Zellkultur, bei der das Gewebe zunächst präpariert wird, um dann den gewünschten Zelltyp zu selektieren und anschließend zu kultivieren. Diese selektierten Zellen haben jedoch eine begrenzte Lebensdauer (Schmitz 2011).

Bei der sekundären Zellkultur werden die Zellen einer primären Kultur vermehrt, subkultiviert und auf Proliferation selektiert, sodass diese zu permanenten Zellkulturen werden können. Diese Fähigkeit zum permanenten Wachstum ist sehr wahrscheinlich abhängig von der genetischen Variabilität der jeweiligen Zellen (Freshney 2015).

Ein Beispiel hierfür ist die RGC-5 Zelllinie. Diese weist zwar viele Eigenschaften der retinalen Ganglienzellen auf, wurde allerdings durch eine Kreuzkontamination mit einer Photorezeptorzelllinie so verändert, dass sie auch Eigenschaften der Photorezeptoren besitzt und diese somit als „Ganglienzell-ähnliche-Zellen“ angesehen werden sollten (Van

Bergen 2009; Krishnamoorthy 2013). Ein weiterer Nachteil der Zellkultur ist, dass das Gewebe nicht im Zellverband untersucht werden kann. Daher werden mit der Organkultur die *in vivo* Bedingungen deutlich besser simuliert.

Die Organkultur stellt zwar keinen vollständigen Ersatz zum Tiermodell dar, ist aber dennoch eine gute Alternative zur Untersuchung von Pathomechanismen und möglichen Therapieansätzen zur Reduzierung von Tierversuchen.

2.5. Modelle zur Untersuchung der Retinadegeneration

Um die zugrunde liegenden Pathomechanismen verschiedener retinaler Erkrankungen, wie z.B. die des Glaukoms verstehen zu können, sind verschiedene experimentelle Modelle nötig. Diese Modelle basieren auf der chemischen Nachahmung möglicher pathologischer Prozesse. Ein bereits etabliertes Modell ist das Schweineretina-Organkultur-Modell. Diese Organkultur kann genutzt werden, um die retinale Degenerationen, ausgelöst durch Hypoxie oder oxidativen Stress, nachzuahmen. Sowohl ein Modell zur Nachahmung einer chemischen Hypoxie durch CoCl_2 , als auch ein Modell zur Nachahmung von oxidativem Stress durch H_2O_2 sind bereits etablierte Modelle der Schweineretinaorgankultur (Hurst 2017; Kuehn 2017).

2.5.1. Modell des oxidativen Stresses

Oxidativer Stress ist definiert als Ungleichgewicht zwischen der Produktion und der Eliminierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Betteridge 2000). ROS entstehen beispielsweise unter physiologischen Bedingungen bei der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien und werden normalerweise durch eine gute Balance zwischen pro- und antioxidativen Stoffen unschädlich gemacht. ROS werden jedoch zum Beispiel auch als Antwort auf Zytokine, exogene Reize oder Bakterien gebildet. Übersteigt die Bildung der ROS die antioxidative Kapazität entsteht oxidativer Stress. Darüber hinaus ist nachgewiesen worden, dass ROS durch die Aktivierung von Hormonen wie Angiotensin-II auch unter normalen Sauerstoffbedingungen HIF-1 α induzieren können (Richard 2000). ROS sind durch ein sehr reaktives freies Elektronenpaar instabile Moleküle. Die daraus folgende Reaktivität der ROS ist die Oxidation von Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren. Durch die Interaktion mit verschiedenen Signalmolekülen führen die ROS zu einer Beeinflussung der Zellproliferation, des Zellüberlebens, der Zelldifferenzierung, des Zellmetabolismus, der antioxidativen und antiinflammatorischen Antwort und der Eisenhomöostase (Ray 2012). Beispiele für freie Radikale sind das Superoxidanion, Stickstoffmonoxid (NO), Peroxinitrit und das Hydroxyl-Radikal (Betteridge 2000).

Ein für diese Arbeit wichtiges Radikal ist NO. NO hat verschiedene physiologische Funktionen. Es initiiert die Vasodilatation, ist ein wichtiger Neurotransmitter und ist, generiert

von Makrophagen, wichtig für die Immunabwehr. Die Synthese von NO erfolgt aus L-Arginin über die drei Isoformen der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS): endotheliale NOS (eNOS), neuronale NOS (nNOS) und die induzierbare NOS (iNOS). eNOS und nNOS produzieren kontinuierlich NO, während iNOS nur durch einen Entzündungsreiz exprimiert wird (Rosselli 1998). Dieser Reiz führt zu einer Aktivierung von Makrophagen, welche daraufhin in großer Menge iNOS exprimieren und somit zu einer hohen NO-Produktion führen (Haefliger 1999). H_2O_2 führt zu Aktivierung von Mikroglia, welche in Folge iNOS exprimieren und große Mengen NO freisetzen (Mander 2006; Hurst 2017).

Oxidativer Stress kommt bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen vor. Bei den meisten Glaukom-Patienten entsteht der oxidative Stress durch den meist vorhandenen hohen IOP (Sacca 2008). In dem erwähnten etablierten Modell wird H_2O_2 , ein starkes Oxidationsmittel, als Auslöser für oxidativen Stress eingesetzt (Winterbourn 2013; Hurst 2017).

2.5.2. Hypoxiemodell

Eine Hypoxie beschreibt die Mangelversorgung eines Organismus, Gewebes oder Organs mit Sauerstoff (Wu 2011). Kommt es zu einer hypoxischen Situation, folgen adaptive Zellreaktionen. Die Zelle ist dabei in der Lage ihren Zellzyklus zu stoppen und ihren Energieverbrauch herabzusetzen. Diese Reaktionen erfolgen u.a. durch eine Initiation von Transkriptionsfaktoren, ausgelöst durch Hypoxie-induzierbare Faktoren (*HIFs*). Von diesen gibt es drei HIF- α –Isoformen, eine davon ist HIF-1 α . HIF-1 α kommt in jeder Zelle vor und ist ein obligater Heterodimer, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit. HIF-1 α liegt unter physiologischen Bedingungen immer in der Zelle vor und wird kontinuierlich abgebaut. Ist genügend Sauerstoff in der Zelle vorhanden, hydroxyliert die Prolyl-Hydroxylase HIF-1 α -Untereinheiten (Abbildung 3). Das hydroxylierte HIF-1 α wird anschließend von der Hoppel Lindau E3 Ubiquitin Ligase erkannt und markiert. Daraufhin folgt der Abbau von HIF-1 α im Proteasom der Zelle (Majmundar 2010).

Kommt es jedoch zu einer Sauerstofflimitation, ist die Aktivität der Prolyl-Hydroxylase so verringert, dass HIF-1 α akkumuliert. Anschließend dimerisiert HIF-1 α mit HIF-1 β im Zellkern, bildet somit einen aktiven Transkriptionsfaktor und bindet an das hypoxic response element (HRE) der DNA. Dadurch kommt es zu einer Initiation der Transkription von Genen, die entweder an der Angiogenese oder am Transport von Sauerstoff beteiligt sind (Wu 2011). Hierzu zählen u.a. die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), Erythropoetin (EPO), die Laktat Dehydrogenase (LDH) und der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) (Huang, Gu et al. 1998; LaManna 2004). Somit ist HIF über die Steuerung der Gentranskription unter anderem am Überleben der Zelle, der Zelldifferenzierung, der Angiogenese, dem Eisenstoffwechsel und dem Energiestoffwechsel beteiligt (Semenza 2003).

Nach einer langanhaltenden Hypoxie kommt es in den Mitochondrien zu einer vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), diese wiederum führen zu Protein-, Lipid- und DNA-Schäden. Zudem kommt es zu einer Unterversorgung der Zelle mit ATP und anschließend zur Apoptose der Zelle (Huang 2014).

Dieser Prozess wird sich beim Hypoxiemodell der Schweineretina-Organkultur von Kuehn et al. (2017) zu Nutze gemacht. Aus verschiedenen vorherigen Modellen ist bekannt, dass hohe Konzentrationen von Kobalt zu einer chemischen Induktion eines hypoxischen Zustands führen (Caltana 2009). Hierbei verdrängt Kobalt das Eisen aus dem Zentrum der Prolyl-Hydroxylase und hemmt diese. Durch diesen Vorgang wird HIF-1 α stabilisiert und nicht abgebaut, wodurch die Prozesse einer oben beschriebenen Hypoxie nachgeahmt werden (Yuan 2003).

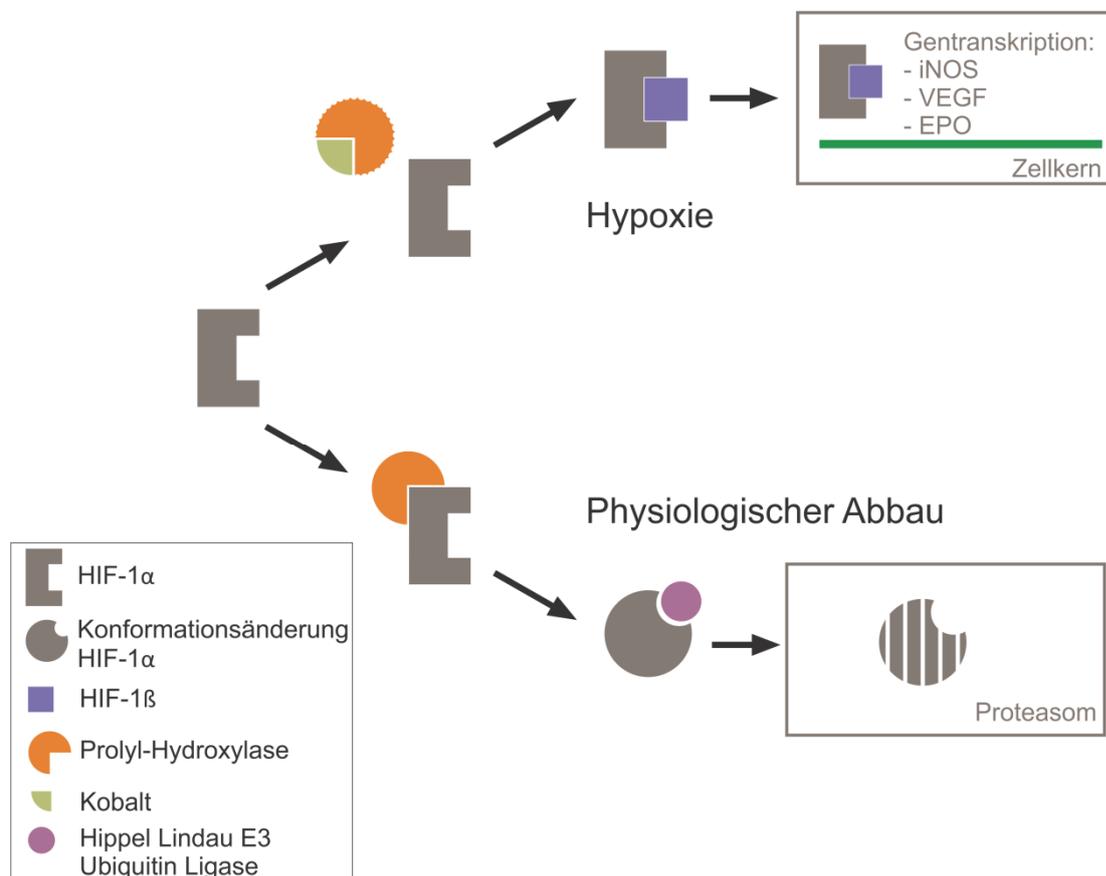


Abbildung 3: HIF-1 α Signalweg, modifiziert nach LaManna et al., 2004

HIF-1 α wird unter physiologischen Bedingungen von der Prolyl-Hydroxylase hydroxyliert. Dadurch kann die Hippel Lindau E3 Ubiquitin Ligase binden und es kommt zum Abbau von HIF-1 α im Proteasom der Zelle. Herrschen jedoch hypoxische Bedingungen oder kommt es zu einer chemischen Induktion einer Hypoxie durch Kobalt, wird die Aktivität der Prolyl-Hydroxylase verringert. Dadurch

akkumuliert HIF-1 α , transloziert in den Zellkern und dimerisiert dort mit HIF-1 β . Durch diesen Vorgang kommt es anschließend zur Initiierung der Gentranskription verschiedener Gene.

2.6. Therapieansätze zur Neuroprotektion

2.6.1. iNOS-Inhibitor 1400W

Der iNOS-Inhibitor 1400W (N-(3-Aminomethyl)-benzylacetamidin) ist ein irreversibler Hemmer von iNOS, welcher selektiv und fest bindet. NO-Synthasen katalysieren L-Arginin zu L-Citrullin und NO (Zhu 2005). Wie erwähnt, kommt es bei einer Hypoxie zur Aktivierung von iNOS über den HIF-Signalweg, wodurch anschließend große Mengen an zytotoxischem NO freigesetzt werden können (LaManna 2004). Im Modell des oxidativen Stresses kommt es durch H₂O₂ zur Aktivierung der Mikroglia, gefolgt durch eine Sezernierung von iNOS (Hurst 2017). Da iNOS sowohl durch Hypoxie als auch durch oxidativen Stress gebildet wird und dadurch große Menge an zytotoxischem NO freigesetzt werden können, sollte iNOS nun zur möglichen Protektion der retinalen Ganglienzellen inhibiert werden. In einer vorherigen Studie der Schweineretinaorgankultur wurde jedoch der iNOS-Inhibitor in den Konzentrationen 10, 100 und 200 μ M nach erfolgter Degeneration mit CoCl₂ erfolglos eingesetzt (Maliha 2017). Dennoch wurde bereits in verschiedenen Studien die neuroprotektive Wirkung des iNOS-Inhibitors nachgewiesen. Bei einem zerebralen Ischämie Modell der Ratte kam es nach Einsatz von 1400W zu einer verminderten Infarktgröße, einem verbesserten neurologischen Score und einem verminderten Gewichtsverlust der Tiere (Parmentier 1999). Auch ein anderes Modell der Maus zeigte vielversprechende Ergebnisse. Hier wurde zum einen iNOS chemisch und zum anderen durch ein knock-out nach ischämischer Retinopathie inhibiert. Durch diese Inhibition kam es zu verringerter Apoptose und verminderter Angiogenese (Sennlaub 2002). Auch zahlreiche weitere Studien führten zu einer Neuroprotektion durch Inhibition von iNOS.

2.6.2. Coenzym Q10

CoenzymQ10 (CoQ10), auch Ubiquinon genannt, ist ein essentieller Co-Faktor beim Elektronentransport und der Energiesynthese in den Mitochondrien. Zudem ist es ein wichtiges Antioxidationsmittel in den Mitochondrien und Lipidmembranen und schützt dort Proteine und Lipide vor Oxidation durch freie Radikale (Yang 2016).

Es gibt bereits viele Studien zur Untersuchung der antioxidativen Wirkung von CoQ10. So führte z.B. die Behandlung von PC12-Zellen mit CoQ10 nach Einleitung von oxidativem Stress durch H₂O₂ zu einer Protektion der Zellen. Hier konnte nachgewiesen werden, dass sowohl CoQ10 direkt, als auch über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) mit anschließender Initiation der Gentranskription antioxidativer Enzyme, zu einer Reduktion von oxidativem Stress führte (Li

2016). Zusätzlich konnte in einem Ischämie-Reperfusionmodell der Ratte nachgewiesen werden, dass die intraokuläre Gabe von CoQ10 zu einer verminderten Freisetzung von Glutamat führt und die RGCs gegen ischämische Schäden schützt (Nucci 2007). Darüber hinaus konnte ein verminderter retinaler Schaden und verminderte Apoptose in der Ganglienzellschicht durch oxidativen Stress *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden (Nakajima 2008).

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Antikörper

Tabelle 1: Darstellung der verwendeten Primärantikörper, QS=Querschnitt, FP=Flachpräparat

Primärer Antikörper	Klonalität/Wirt	Hersteller/Ort	Verdünnung		Markierte Struktur
			QS	FP	
Anti-RBPMS	Polyklonal/Kaninchen	Abcam (Cambridge, UK)	1:20 0	X	Retinale Ganglienzellen
Anti-RBPMS	Polyklonal/Kaninchen	Merck Millipore (Burlington, USA)	1:20 0	1:500	Retinale Ganglienzellen
Anti-HIF-1 α	Monoklonal/Maus	BD Biosciences (San José, USA)	1:10 0	X	Hypoxische Zellen
Anti-Brn-3a	Polyklonal/Ziege	Santa Cruz (Dallas, USA)	1:10 0	X	Retinale Ganglienzellen
Anti-NeuN	Polyklonal/Huhn	Merck Millipore (Burlington, USA)	1:50 0	X	Retinale Ganglienzellen

Tabelle 2: Darstellung der verwendeten Sekundärantikörper, QS=Querschnitt, FP=Flachpräparat

Sekundärer Antikörper	Hersteller/Ort	Verdünnung	
		QS	FP
Esel-anti-Kaninchen, Alexa 555	Merck Millipore (Burlington, USA)	1:400	1:600
Ziege-anti-Maus, Alexa 488	Invitrogen (Carlsbad, USA)	1:400	X
Esel-anti-Ziege, Alexa 488	Dianova (Hamburg, Deutschland)	1:500	X
Esel-anti-Huhn, Cy3	Merck Millipore (Burlington, USA)	1:400	X

3.1.2. Chemikalien

Tabelle 3: Darstellung der verwendeten Chemikalien

Substanz	Hersteller/Ort
Aceton (CH ₃ COCH ₃)	Merck Millipore (Burlington, USA)
B-27 [®] Supplement (50x)	Gibco [®] , Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Citronensäure-Monohydrat	Bernd Kraft (Duisburg, Deutschland)
Coenzym Q10	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
D(+)-Saccharose	VWR International GmbH (Radnar, USA)
Essigsäure, 99-100% (Eisessig)	Merck Millipore (Burlington, USA)
Eosin	Merck Millipore (Burlington, USA)
Ethanol, 70 % (unvergällt)	Waldeck GmbH & Co. KG (Münster, Deutschland)
Ethanol, 70 % (vergällt)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol, 96 %	Merck Millipore (Burlington, USA)
Ethanol, 100 %	J. T. Baker (Waltham, USA)
Eukitt [®]	O. Kindler GmbH (Freiburg, Deutschland)
Hämalaunlösung	Merck Millipore (Burlington, USA)
ImmuMount [®]	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Kobaldchlorid 0,1 M (CoCl ₂)	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
L-Glutamine 200 mM	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Lutrol [®] F127	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)

N-2 Supplement	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Neurobasal®-A Medium	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Normales Esel-Serum (NDS)	Dianova (Hamburg, Deutschland)
Normales Ziegen-Serum (NGS)	GeneTex (Irvine, USA)
Paraformaldehyd (PFA)	Merck Millipore (Burlington, USA)
Penicillin/Steptomycin	Biochrom GmbH/Merck (Berlin, Deutschland)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS 10x)	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, USA)
Sodium Azid	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Triton X-100 (T-Octylphenoxypoly-ethoxyethanol)	Merck Millipore (Burlington, USA)
Wasserstoffperoxid, 30%ig	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Xylol (C ₆ H ₄ (CH ₃) ₂)	J.T. Baker (Waltham, USA)
1400W iNOS-Inhibitor	Merck Millipore (Burlington, USA)
4',6-Diamin-2-Phenylindol (DAPI)	Dianova (Hamburg, Deutschland)

3.1.3. Geräte

Tabelle 4: Darstellung der verwendeten Geräte

Gerät	Name	Hersteller/Ort
Abzug	Abzug, TA 1200x900	Vinitex (Coswig, Deutschland)
Analysenwaage	ACJ 220-4M	Kern & Sohn GmbH (Balingen, Deutschland)
Brutschrank	Heraeus Function Line	Heraeus Medical GmbH (Wehrheim, Deutschland)
CO ₂ -Inkubator	Heraeus, Hera Cell	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Gefrierschrank	Liebherr Premium	Liebherr (Bulle, Schweiz)

Gefrierschrank	Sanyo Ultra Low, MDF-193	SANYO Electric Co., Ltd. (Ösaka, Japan)
Immunfluoreszenz-Mikroskop	Axio Imager M1	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Kühlschrank	Dometic ML 360 CS	Dometic GmbH (Siegen, Deutschland)
Lichtmikroskop	Axiovert 40C	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Mikrotom (Kryostat)	Microm HM560	Microm GmbH (Neuss, Deutschland)
Mikroliterpipetten	Single-Chanel Pipette: 0,5-10 µl 2-20 µl 10-100 µl 20-200 µl 100-1000 µl	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipettus	Eppendorf Easypet®	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Rührer mit Wärmeplatte	HTS 1003	LMS (Brigachtal, Deutschland)
Schüttler	Mini Blot Mixer	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Sterilbank	Hera Cell	Heraeus Medical GmbH (Wehrheim, Deutschland)
Vortexer	VTX-3000L	LMS (Brigachtal, Deutschland)
Waage	EMS 300-3	Kern & Sohn GmbH (Balingen, Deutschland)
Wasserbad		Memmert GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland)
Zentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

3.1.4. Lösungen und Puffer

Tabelle 5: Darstellung der verwendeten Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Bestandteile
Eosinlösung	1 ml Stammlösung Eosin + 100 ml 100 %iges Ethanol + 0,5 ml Eisessig
Eosin-Stammlösung	1 g Eosin + 100 ml VE Wasser
Lutrol-Stammlösung	20 mg Lutrol + 50 ml VE Wasser

PBS-Puffer (pH 7,0)	250 ml 10x PBS + 2,5 l VE Wasser
PBS/0,1 % Triton X-100	10 µl Triton-X-100 + 10 ml 1x PBS
PBS/0,2 % Triton X-100	20 µl Triton-X-100 + 10 ml 1x PBS
PBS/2 % Triton X-100	200 µl Triton-X-100 + 10 ml 1x PBS
VE-Wasser/0,5 % Triton X-100	50 µl Triton-X-100 + 10 ml VE-Wasser
4 %iges Paraformaldehyd	4 g Paraformaldehyd + 100 ml PBS
15 %ige Saccharose (pH 7,4)	1,5 g Saccharose + 10 ml VE Wasser
30 %ige Saccharose (pH 7,4)	3 g Saccharose + 10 ml VE Wasser

3.1.5. Software

Tabelle 6: Darstellung der verwendeten Software

Programm	Hersteller
Ant Renamer, Version 2.10.0	Ant Software
Axio Vision LE 4.8.2.0	Carl Zeiss MicroImaging GmbH
CorelDRAW Graphics Suite X8, Version 18.1.0.661	Corel Corporation
Corel PaintShop Pro X8, Version 18.1.0.67	Corel Corporation
EndNote X4, Version 14.0.0.4845	Thomson Reuters
Image J 1.47 v	Wayne Rasband, NIH
Microsoft Office Enterprise 2007, Version 12.0.6612.1000	Microsoft Corporation
STATISTICA 13.0.159.4, 64-bit, Version 13.0.159.4	Dell, Inc.
Zen 2.3 SP1	Carl Zeiss Microscopy GmbH

3.1.6. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Darstellung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material	Name	Hersteller/Ort
Abdecktuch	2-lagig (blau), 75x90 cm	Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG (Rengsdorf, Österreich)
Abdecktuch	Gelb, Molinea®L	Paul Hartmann AG (Heidenheim, Deutschland)
Biopsie-Stanze	Disposable Biopsy Punch, 6 mm	Pfm Medical AG (Köln, Deutschland)

Deckgläschen	24x60 mm 20x20 mm	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Einbettkassetten	Cryomold® Intermediate, 15x15x15 mm	Sakura® Finetek USA Inc. (Alphen aan den Rijn, Niederlande)
Einmalpipetten	Serologische Pipette, steril, 5 ml, 10 ml, 25 ml	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Handschuhe	Vasco® Nitril blue	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Objektträger	HistoBond® Adhäsive 76x26x1mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Objektträger	Menzel-Gläser, SuperFrost®, 76x26x1mm	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Parafilm	Parafilm	Bemis (Neenah, USA)
Petrischalen	Ø 60 mm Ø 140 mm	Geneo, Orange Scientific (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen	epT.I.P.S ^R Standard 50-1000 µl Standard/Bulk 2-200 µl Standard/Bulk 0,1-10 µl	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße	Falcon® 50/ 15 ml Falcon® 50/ 50 ml	Corning Science Mexico (Reynosa, Mexico)
Reaktionsgefäße	Eppendorf Tubes® 500 µl; 1000 µl; 2000 µl; 5000 µl	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Shandon Coverplates	Thermo Scientific™ Shandon Coverplate™	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Tissue-Tek	NEG-50™	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Vernichtungsbeutel	300x200x0,05 mm	Peter Oehmen GmbH (Essen, Deutschland)
Zellkultureinsatz	Millipore Millicell® 30 mm Diameter, Hydrophiles PTFE, 0,4 µm	Merck Millipore (Burlington, USA)
6-Well-Platten	Cellstar®, 6-Well-Cell Culture Plate	Greiner Bio-one (Kremsmünster, Österreich)
12-Well-Platten	TC-Platte 12 Well, Cell+,F	Sarstedt AG & Co (Hemer, Deutschland)

3.1.7. Verwendetes Labormaterial

Tabelle 8: Darstellung des verwendeten Labormaterials

Material	Beschreibung	Hersteller/Ort
Bechergläser	20 ml, 200 ml, 1000 ml	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Biopsie-Stanze	Einmal Biopsie-Stanze	Pfm medical AG (Köln, Deutschland)
Flaschen mit Schraubverschluss	50 ml, 80 ml, 1000 ml	Simax (Selb, Deutschland)
Löffel	VW 7x9mm	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Messzylinder	250 ml, 500 ml, 1000 ml	VITLAB GmbH (Großostheim, Deutschland)
Mikroschere		Geuder AG (Heidelberg, Deutschland)
Pinzetten		Rubris Outils SA (Stabio, Schweiz)
Skalpell		B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Trichter		VITLAB GmbH (Großostheim, Deutschland)

3.2. Methoden

3.2.1. Präparation der Schweineaugen

Zunächst wurden die Schweineaugen am Schlachthof in Bochum abgeholt. Eine entsprechende Registrierungsnummer für die Berechtigung hierfür vom Veterinäramt lautet: DE-05911002921. Die Augen wurden direkt nach dem Schlachtprozess frisch entnommen, auf Eis gelagert und zum Labor transportiert. Im Labor wurden diese zunächst von extraokulärem Muskel- und Bindegewebe befreit und zur oberflächigen Desinfektion in 70%igen, eiskalten, unvergällten Ethanol getaucht und anschließend zum Transfer zur Sterilbank in eiskaltes PBS überführt. Die folgende Präparation der Schweineretinae wurde unter der Sterilbank durchgeführt. Die Augen wurden auf einer 60mm Zellkulturschale mittels einer chirurgischen Pinzette von außen fixiert. Wie in Abbildung 4 zu erkennen, wurde mit Hilfe eines Skalpells auf Höhe des Zentrums der Pupille senkrecht durch die Kornea gestochen, dann bis zur Ora serrata eingeschnitten und anschließend mit einer Schere am Limbus entlang geschnitten, sodass der vordere Teil des Auges entfernt wurde. Das nun

becherförmige Auge wurde von Linse und Glaskörper befreit und in sterilem PBS gewaschen, um Reste von diesen zu entfernen. Nun wurde das Auge kleeblattförmig Richtung Discus nervi optici aufgeschnitten. Die so entstandenen vier Anteile dienten als Grundlage für die Ausstanzung der je vier Retinaeproben pro Auge. Die Ausstanzung wurde mittels einer Hautstanze durchgeführt, die möglichst zentrumsnah angesetzt wurde und dann vorsichtig kreisförmig bewegt wurde, um die Retinaprobe effektiv entnehmen zu können. Anschließend wurde die Stanze entfernt und die Probe mittels eines Löffels vorsichtig vom Pigmentepithel gelöst und in einer mit Neurobasal-A-Medium gefüllten Petrischale gewaschen, um Reste vom Pigmentepithel zu entfernen. Die entnommene Retinaprobe wurde dann auf einen Zellkultureinsatz übertragen, in eine 6-Well-Platte überführt und mit 1 ml Neurobasal-A-Medium, versetzt mit L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin, B 27, sowie N2 bedeckt. Bei diesem Medium wurden zuvor 473 ml Neurobasal A-Medium, 10 ml B27 Supplement, 5 ml N2 Supplement, 10 ml Penicillin/Streptomycin und 2 ml L-Glutamin gemischt und in 50 ml-Portionen im Kühlschrank gelagert. Das Neurobasal A Medium wurde in Kombination mit B27 speziell für die Kultivierung von Neuronen entwickelt, um die Vitalität, die Funktionalität und die Reifung von Neuronen möglichst lange aufrechterhalten zu können.

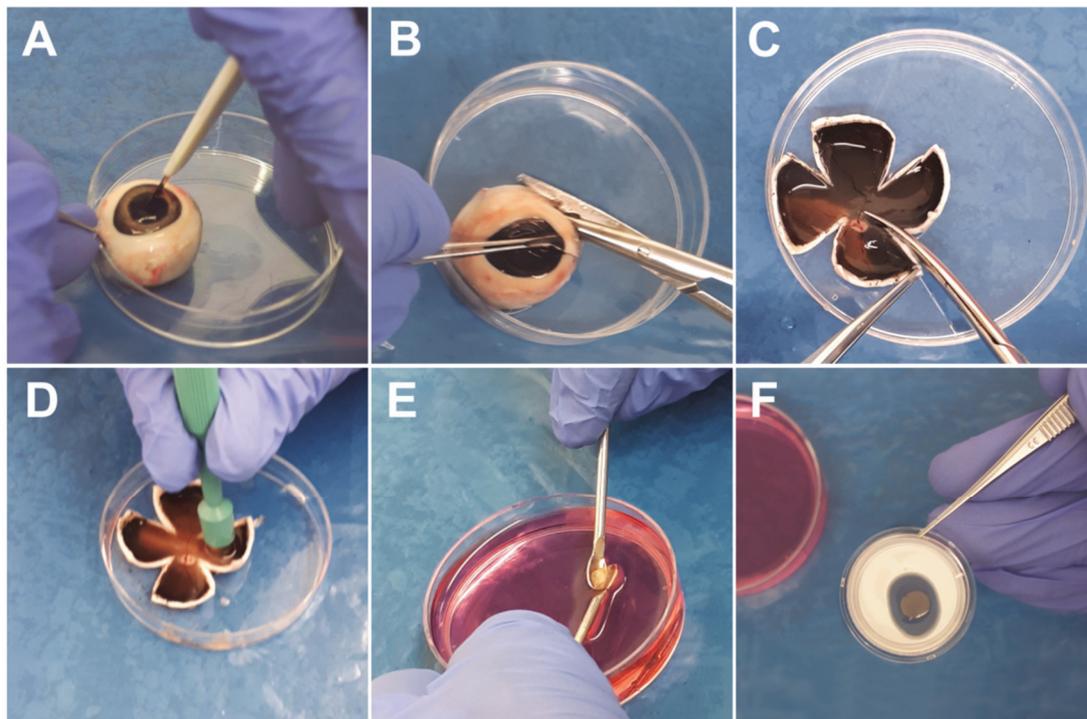


Abbildung 4: Präparation der Schweineaugen

(A) Senkrechtes Einstechen in das Auge mittels eines Skalpells. (B) Schneiden entlang des Limbus corneae. (C) Herstellen einer Kleeblattstruktur. (D) Herausstanzen der Retinaprobe mittels einer Hautstanze. (E) Waschen der Probe in Neurobasal-A-Medium. (F) Retinaprobe auf Zellkulturfilter.

3.2.2. Kultivierung mit Wasserstoffperoxid

Die Kultivierung der Proben für die Wasserstoffperoxid (H_2O_2) Pilotstudie wurde in Zusammenarbeit mit der Bachelorstudentin Fabienne Reiß durchgeführt (Reiß 2018).

Die Kultivierung in der Pilotstudie mit H_2O_2 erfolgte für acht Tage bei 37 °C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 -Sättigung. Zur Verifizierung des bereits etablierten Modells des oxidativen Stresses des Experimental Eye Research Instituts in Bochum wurden die Retinae acht Tage für diese Pilotstudie kultiviert (Hurst 2017). Auch wurde diese Kultivierung durchgeführt, um in den nachfolgenden Studien weiter mit diesem Modell arbeiten zu können und anhand dessen potentielle Neuroprotektiva zu testen. Gleiches gilt für die zweite durchgeführte Pilotstudie (s. Abschnitt 3.2.3.).

Die Wirkung des H_2O_2 wurde anhand von zwei Gruppen in der Pilotstudie analysiert. Die Kontrollgruppe erhielt hierbei während der gesamten Kultivierung bei jedem Mediumswechsel ausschließlich Nährmedium. Die zweite Gruppe wurde am ersten Kultivierungstag mit 300 μl Wasserstoffperoxid behandelt (n=10/Gruppe).

Direkt nach der Explantation, also an Tag null, erfolgte ein erster vollständiger Mediumswechsel mit Nährmedium in beiden Gruppen. An Tag eins wurde die Behandlung mit 300 μl H_2O_2 für exakt drei Stunden in der mit Wasserstoffperoxid behandelten Gruppe durchgeführt (Abbildung 5). Hierzu wurde das Nährmedium der mit Wasserstoffperoxid behandelten Gruppe mit 300 μl H_2O_2 versetzt. Die Kontrollgruppe erhielt einen vollständigen Austausch des Nährmediums. Nach drei Stunden wurde erneut ein vollständiger Austausch des Mediums in beiden Gruppen durchgeführt, sodass die H_2O_2 - Behandlung zu diesem Zeitpunkt endete. An den folgenden Tagen der Kultivierung war die Behandlung der beiden Gruppen identisch. Sowohl an Tag drei als auch an Tag fünf und sieben erfolgten halbe Mediumswechsel, das heißt ein Austausch der Hälfte des Nährmediums in beiden Gruppen. An Tag acht wurden die Retinae kryokonserviert. Die entstandenen Proben wurden im weiteren Verlauf für jeweils eigenständige Studien, sowohl für die vorliegende Arbeit, als auch für die Bachelorarbeit von Frau Reiß, verwendet.

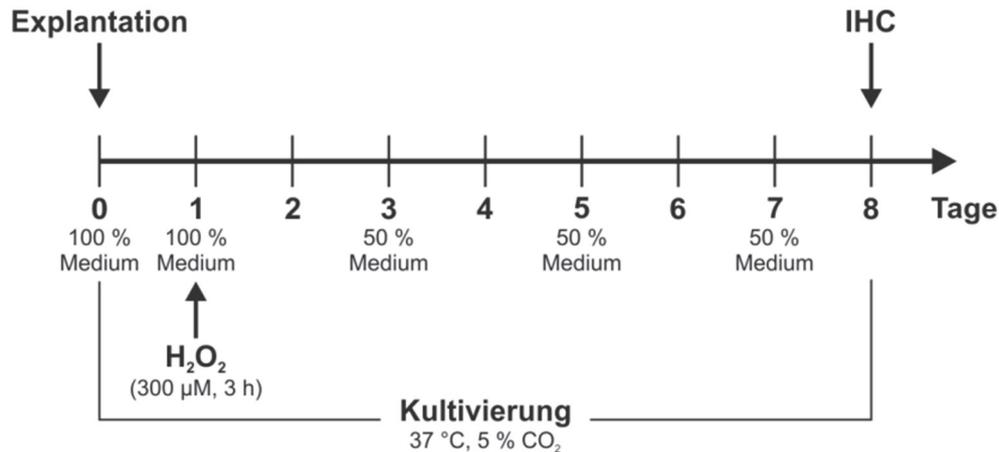


Abbildung 5: Zeitstrahl der Degeneration mit H₂O₂

Die Kultivierung in der Pilotstudie erfolgte acht Tage. Am Tag der Explantation erfolgte ein vollständiger Austausch des Nährmediums in beiden Gruppen. Am Tag eins wurde die Behandlung mit 300 µM H₂O₂ für exakt 3 h durchgeführt. Im Anschluss an diese 3 h folgte ein Austausch des mit H₂O₂ versetzten Mediums gegen Nährmedium ohne H₂O₂-Zusatz. Die Kontrollgruppe erhielt ebenfalls einen Austausch des Mediums. Ein Wechsel von 50% des Mediums beider Gruppen wurde an den nachfolgenden Tagen drei, fünf und sieben durchgeführt. Am Tag acht erfolgte dann die Kryokonservierung für weiterfolgende Analysen. IHC=Immunhistochemie, Kultivierung bei 37°C und 5% CO₂.

3.2.3. Kultivierung mit Kobaltchlorid

Die Kultivierung der Proben für die Kobaltchlorid (CoCl₂)-Pilotstudie wurde in Zusammenarbeit mit der Bachelorstudentin Fabienne Reiß durchgeführt (Reiß 2018).

Die Behandlung der Retinae mit CoCl₂ in dieser Pilotstudie erfolgte acht Tage bei 37 °C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Sättigung. Wie bereits in Abschnitt 2.2.2. erwähnt wurde auch diese Kultivierung durchgeführt, um die am Experimental Eye Research Institut in Bochum durchgeführten Analysen zu verifizieren und um weiter mit diesem Modell arbeiten zu können (Kuehn 2017).

Die Wirkung des CoCl₂ wurde in der vorliegenden Pilotstudie anhand von zwei Gruppen analysiert. Eine Kontrollgruppe, die während der Kultivierung nur Nährmedium erhielt und eine mit jeweils 300 µl CoCl₂ versetztem Nährmedium behandelte Gruppe (n=10/Gruppe).

Wie in Abbildung sechs zu erkennen ist, wurde direkt nach der Explantation, also an Tag null, ein erster vollständiger Mediumswechsel in beiden Gruppen durchgeführt. Am Tag eins startete die 48 stündige (h) Behandlung mit 300 µM CoCl₂ versetztem Medium in der mit CoCl₂ behandelten Gruppe. In der Kontrollgruppe erfolgte ein vollständiger Austausch des Nährmediums. Am folgenden Tag wurden die Retinae noch einmal wie an Tag eins zur gleichen Uhrzeit behandelt. In der Kontrollgruppe wurde demnach ein vollständiger Austausch des Nährmediums durchgeführt. Die mit CoCl₂ behandelte Gruppe erhielt mit

300 μM CoCl_2 versetztes Medium. An Tag drei, genau 48 h nach Start der Behandlung, erfolgte bei beiden Gruppen ein vollständiger Austausch des Mediums gegen frisch angesetztes Nährmedium, ohne Zusatz von CoCl_2 . Die 48 stündige Behandlung mit CoCl_2 war demnach abgeschlossen. An Tag fünf und sieben wurde jeweils 50% des Nährmediums (500 μl) beider Gruppen ausgetauscht. Am achten Tag der Kultivierung erfolgte die Kryokonservierung der Retinae. Die entstandenen Proben wurden im weiteren Verlauf für jeweils eigenständige Studien, sowohl für die vorliegende Arbeit, als auch für die Bachelorarbeit von Frau Reiß, verwendet.

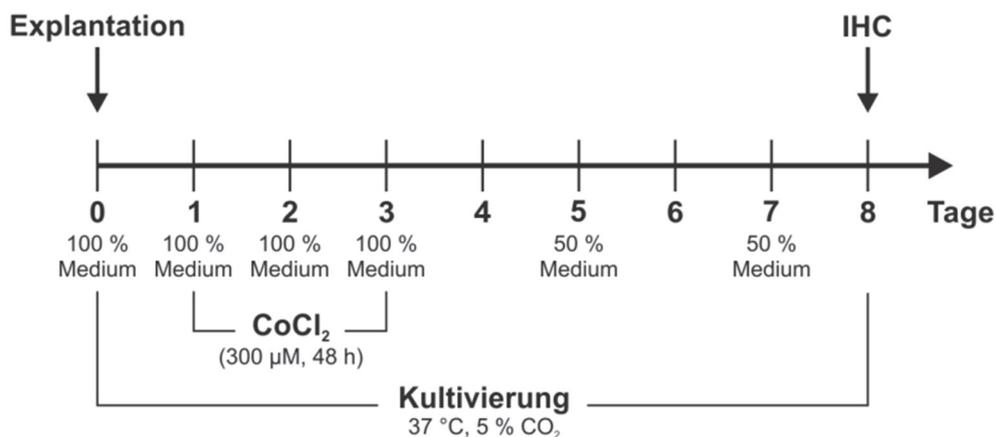


Abbildung 6: Zeitstrahl der Degeneration mit CoCl_2

Die Kultivierung der CoCl_2 -Pilotstudie erfolgte acht Tage. An Tag null wurde ein vollständiger Mediumswechsel in beiden Gruppen durchgeführt. An den Tagen eins und zwei wurde Medium versetzt mit 300 μM CoCl_2 auf die mit CoCl_2 behandelte Gruppe pipettiert. In der Kontrollgruppe erfolgte zeitgleich ein Austausch des Nährmediums. An Tag drei wurde die Degeneration mittels CoCl_2 durch einen vollständigen Wechsel des CoCl_2 versetzten Mediums gegen Nährmedium ohne CoCl_2 -Zusatz beendet. In der Kontrollgruppe erfolgte ebenfalls ein vollständiger Wechsel des Mediums. Sowohl an Tag fünf, als auch an Tag sieben wurde nur die Hälfte des Mediums ausgetauscht. An Tag acht wurden die Retinaprobe bei -80°C für weitere Analysen kryokonserviert. IHC=Immunhistochemie, Kultivierung bei 37°C und 5% CO_2 .

3.2.4. Kultivierung mit dem iNOS-Hemmer 1400W

Die Kultivierung der iNOS-Inhibitorstudien wurde in Zusammenarbeit mit der Bachelorstudentin Fabienne Reiß durchgeführt (Reiß 2018). Die entstandenen Proben wurden im weiteren Verlauf für jeweils eigenständige Studien verwendet.

3.2.4.1. Modell des oxidativen Stresses

Die potentiell neuroprotektiven Effekte des iNOS-Inhibitors wurden im Modell des oxidativen Stresses für vier und acht Tage getestet. Diese Studien wurden für die Immunhistochemie (vier Tage: n=9-10/Gruppe; acht Tage: n=10/Gruppe) für beide genannte Zeitpunkte kultiviert. Ebenso wurde die Kultivierung für die qRT-PCR Untersuchungen (vier Tage:

n=10/Gruppe; acht Tage: n=10/Gruppe) der Arbeitsgruppe der Universität Tübingen für beide genannten Zeitpunkte übernommen. Diese Proben wurden nach der Kryokonservierung den Mitarbeitern der Universität Tübingen übergeben und in vorliegender Arbeit nicht weiter behandelt.

Bei der Kultivierung der Retinae mit dem iNOS-Hemmer wurde die Wirkung des iNOS-Inhibitors anhand von drei Gruppen analysiert. Eine Kontrollgruppe (Kontrolle), eine mit 300 μM H_2O_2 behandelte Gruppe und eine mit 300 μM H_2O_2 + 500 μM iNOS-Inhibitor behandelte Gruppe. Die Kultivierungsbedingungen waren identisch mit den zuvor beschriebenen Pilotstudien (37 °C; 5% CO_2). Wie in Abbildung 7 zu erkennen, erfolgte an Tag null ein vollständiger Wechsel des Mediums aller drei Gruppen. Die mit H_2O_2 behandelte Gruppe wurde an Tag eins drei Stunden mit 300 μM H_2O_2 versetztem Medium behandelt. In der iNOS-Inhibitor Gruppe wurde ebenso für drei Stunden mit 300 μM H_2O_2 versetztem Medium behandelt, jedoch wurde dieses Medium auch mit 500 μM iNOS-Inhibitor versetzt. Anschließend wurde in allen drei Gruppen nach drei Stunden ein Austausch des Mediums durchgeführt. Die Kontrollgruppe und die mit H_2O_2 behandelten Gruppen erhielten frisches Nährmedium (ohne Zusatz von H_2O_2). Die mit H_2O_2 und iNOS-Inhibitor behandelte Gruppe erhielt nun nur mit 500 μM iNOS-Inhibitor versetztes Medium. An Tag drei erfolgte ein vollständiger Mediumswechsel in der Kontrollgruppe und in der mit 300 μM H_2O_2 behandelten Gruppe, sowie ein Austausch des Mediums der iNOS-Inhibitor-Gruppe gegen frisches Medium versetzt mit 500 μM iNOS-Inhibitor. Nach vier Tagen Kultivierung und exakt 72 h nach Start der Behandlung mit dem iNOS-Inhibitor wurden die Retinae der vier-Tage-Studie kryokonserviert. Folglich wurde in der acht Tage Studie zu diesem Zeitpunkt ein vollständiger Austausch des Mediums in allen Gruppen durchgeführt, sodass die 72-stündige Behandlung mit dem iNOS-Hemmer endete. In der acht Tage Studie wurde an Tag sechs noch ein Austausch von 50% des Mediums angeschlossen, bevor die Retinae an Tag acht kryokonserviert wurden.

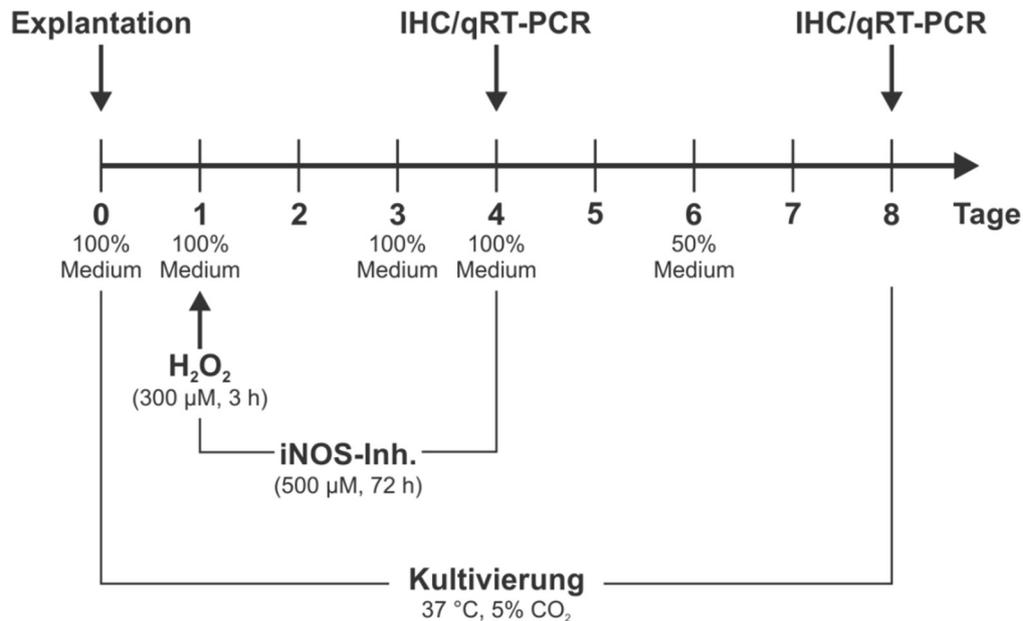


Abbildung 7: Zeitstrahl der Kultivierung mit dem iNOS-Inhibitor 1400W im Modell des oxidativen Stresses

Die Kultivierung erfolgte vier bzw. acht Tage. Am Tag der Explantation wurde ein vollständiger Austausch des Mediums durchgeführt. Am Tag eins wurde in der mit H₂O₂ behandelten Gruppe die Behandlung mit 300 µM H₂O₂ für 3 h durchgeführt. In der mit iNOS-Inhibitor behandelten Gruppe wurde die Behandlung mit 500 µM iNOS-Inhibitor parallel zur Behandlung mit 300 µM H₂O₂ durchgeführt. Nach drei Stunden erfolgte ein Wechsel des Mediums in allen Gruppen, wobei die mit iNOS-Inhibitor behandelte Gruppe mit iNOS-Hemmer versetztes Medium erhielt. Die Behandlung mit dem iNOS-Inhibitor erfolgte insgesamt 72 h. Bei einer viertägigen Kultivierung wurden die Proben exakt nach 72h Behandlung mit dem iNOS-Hemmner für weitere Analysen eingefroren. Bei der achttägigen Kultivierung erfolgte ein Austausch des Mediums in allen Gruppen und eine weitere Kultivierung bis zur Kryokonservierung an Tag acht.

3.2.4.2. Hypoxiemodell

Zur Untersuchung der potentiell protektiven Wirkung des iNOS-Inhibitors 1400W gegen Hypoxie wurden die Retinae für vier und acht Tage kultiviert. Diese Retinae wurden sowohl für die Immunhistochemie der retinalen Ganglienzellen für beide Zeitpunkte (vier Tage: n=10/Gruppe; acht Tage: n=10/Gruppe), als auch für die qRT-PCR Untersuchungen der Universität Tübingen für beide Zeitpunkte (vier Tage: n=10/Gruppe; acht Tage: n=10/Gruppe) kultiviert. Die qRT-PCR-Proben wurden nach der Kultivierung und Kryokonservierung von einem Kooperationspartner der Universität Tübingen untersucht und in vorliegender Arbeit nicht weiter bearbeitet. Die Wirkung des iNOS-Inhibitors wurde anhand von drei Gruppen analysiert. Eine Kontrollgruppe, eine mit 300 µM CoCl₂ behandelte Gruppe und eine mit 300 µM CoCl₂ + 500 µM iNOS-Inhibitor behandelte Gruppe. An Tag null erfolgte bei allen Gruppen ein vollständiger Mediumswechsel. Die Kontrollgruppe wurde über den

gesamten Zeitraum mit Medium ohne schädigende oder protektive Substanz behandelt. In der mit CoCl_2 behandelten Gruppe wurde Medium, versetzt mit $300 \mu\text{M}$ CoCl_2 für 48 h eingesetzt, dies erfolgte nach dem Prinzip wie in der zuvor beschriebenen Pilotstudie (Abbildung 7). Die Behandlung mit dem iNOS-Inhibitor erfolgte mit einer Konzentration von $500 \mu\text{M}$ für 72 h, wobei die Behandlung parallel mit der Behandlung mit CoCl_2 an Tag eins gestartet wurde. In den anschließenden Mediumswechseln wurde der iNOS-Inhibitor und CoCl_2 immer frisch zu dem Medium hinzugesetzt und das Medium vor dem Start der Behandlung auf 37°C im Wasserbad erhitzt. Bei der vier Tage durchgeführten Studie erfolgte exakt 72 h nach Start der Behandlung, also an Tag vier die Kryokonservierung der Retinae. Dies entspricht in der vier Tage Studie dem Ende der iNOS-Inhibitor Therapie. Bei der acht Tage durchgeführten Studie endete die iNOS-Inhibitor Behandlung durch einen vollständigen Austausch des mit iNOS-Inhibitor versetzten Mediums gegen Medium ohne Zusatz von iNOS-Inhibitor. Ebenfalls wurde ein Austausch des Mediums der anderen Gruppen durchgeführt. Während der weiteren Kultivierung erfolgte ein Austausch von 50% des Mediums aller drei Gruppen an Tag sechs und anschließend die Kryokonservierung an Tag acht.

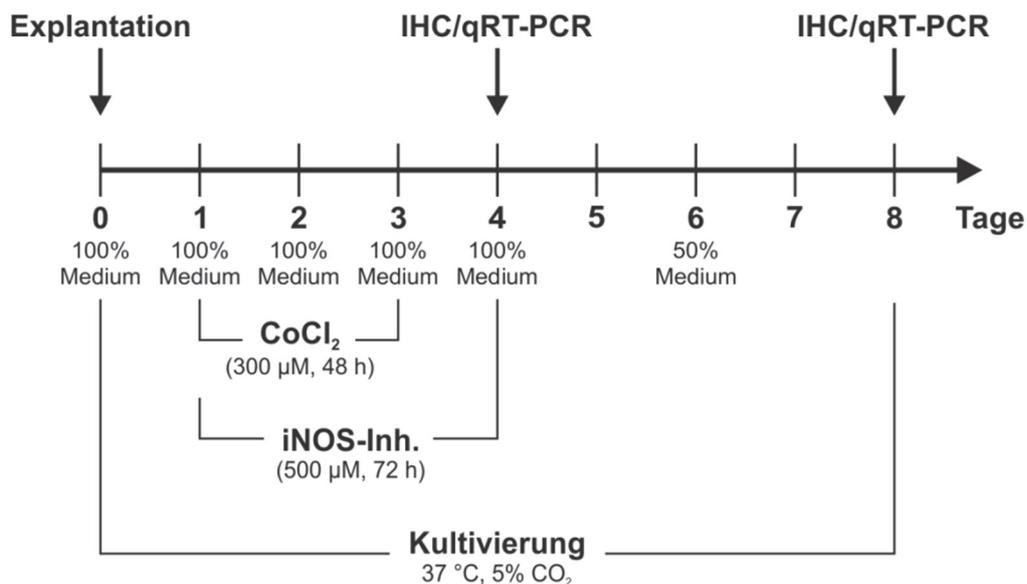


Abbildung 8: Zeitstrahl der Kultivierung mit dem iNOS-Inhibitor 1400W im Hypoxiemodell

Die Kultivierung erfolgte vier bzw. acht Tage. An Tag eins wurde die mit CoCl_2 behandelte Gruppe mit $300 \mu\text{M}$ CoCl_2 versetztes Medium für 48 h behandelt. In der mit iNOS-Inhibitor behandelten Gruppe wurde die Behandlung mit $500 \mu\text{M}$ iNOS-Inhibitor parallel zur Behandlung mit CoCl_2 an Tag eins durchgeführt.

An Tag zwei folgte ein Mediums-Austausch in allen drei Gruppen. Die Kontrollgruppe erhielt Nährmedium, die mit CoCl_2 behandelte Gruppe erhielt mit $300 \mu\text{M}$ CoCl_2 versetztes Medium und die mit CoCl_2 und iNOS-Hemmer behandelte Gruppe erhielt Medium versetzt mit iNOS-Hemmer und CoCl_2 . An Tag drei endete die CoCl_2 -Behandlung, exakt 48h nach Beginn. Hierzu wurde das Medium gegen Medium ohne Zusatz von CoCl_2 ausgetauscht. In der mit iNOS-Inhibitor behandelten Gruppe

wurde das Medium ausgetauscht durch Medium ausschließlich versetzt mit iNOS-Inhibitor. An Tag vier wurden die Retinae, 72 h nach Start der Behandlung mit dem iNOS-Hemmer kryokonserviert. Wurde die Kultivierung jedoch acht Tage durchgeführt, wurde das Medium aller Gruppen gegen frisches Nährmedium ausgetauscht und die iNOS-Hemmer Behandlung endete somit. Ein weiterer Austausch von 50% des Mediums wurde an Tag sechs abgeschlossen und die Retinae an Tag acht kryokonserviert. IHC=Immunhistochemie, Kultivierung bei 37°C und 5% CO₂.

3.2.5. Kultivierung mit Coenzym Q10

Die Kultivierung der mit Coenzym Q10 (CoQ10) behandelten Retinae zur Protektion der retinalen Ganglienzellen vor oxidativem Stress, ausgelöst durch H₂O₂, erfolgte vier Tage (n=5/Gruppe). Da CoQ10 hydrophob ist, wurde Lutrol als Emulgator eingesetzt. Dazu wurde eine 0,04%ige Lutrol Lösung verwendet. Diese Lösung wurde anschließend mit CoQ10 verdünnt und mit Medium versetzt, sodass eine Endkonzentration von 100 µM CoQ10 entstand. Um die potentiell protektive Wirkung von CoQ10 zu testen, wurden vier Gruppen untersucht. Eine Kontrollgruppe, eine nur mit Lutrol-Stammlösung behandelte Gruppe, eine mit 300 µM H₂O₂ behandelte Gruppe und eine mit 300 µM H₂O₂ + 100 µM CoQ10 behandelte Gruppe. Die Behandlung mit H₂O₂ wurde für drei Stunden an Tag eins durchgeführt. Wie in Abbildung acht zu erkennen wurde an Tag eins in der mit CoQ10 und H₂O₂ behandelten Gruppe zeitgleich zur Behandlung mit H₂O₂, die Behandlung mit 100 µM CoQ10 für 48 h gestartet. Nach dreistündiger Behandlung mit H₂O₂ wurde diese durch einen Austausch des Mediums in der mit H₂O₂ behandelten Gruppe beendet. In der mit CoQ10 und H₂O₂ behandelten Gruppe wurde dazu das mit H₂O₂ und CoQ10 versetzte Medium durch nur mit CoQ10-versetztes Medium ausgetauscht. Die mit Lutrol behandelte Gruppe erhielt ausschließlich Lutrol versetztes Medium und die Kontrollgruppe reines Nährmedium. An Tag vier erfolgte, 48 h nach Start der Behandlung mit CoQ10 die immunhistochemische Markierung der Retinae. In einer anschließenden Studie wurde noch einmal eine Konzentration von 300 µM CoQ10 (n=6/Gruppe) im gleichen Modell getestet.

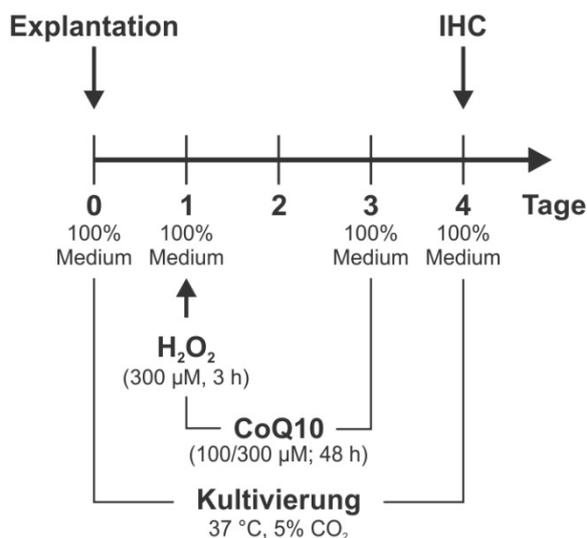


Abbildung 9: Zeitstrahl der Kultivierung mit Coenzym Q10 im Modell des oxidativen Stresses

An Tag eins wurde die dreistündige Behandlung mit 300 µM H₂O₂ in der mit H₂O₂ behandelten Gruppe und in der mit CoQ10 + H₂O₂ behandelten Gruppe durchgeführt. Das Medium der mit CoQ10 + H₂O₂ behandelten Gruppe, war je nach durchgeführter Studie zusätzlich zu 300 µM H₂O₂ noch mit 100 µM, bzw. 300 µM CoQ10 versetzt. Nach drei Stunden wurde in der mit H₂O₂ behandelten Gruppe das Medium gegen frisches Nährmedium ausgetauscht. Wohingegen in der mit CoQ10 + H₂O₂ behandelten Gruppe ein Austausch gegen mit CoQ10 versetztes Medium erfolgte. Die mit Lutrol behandelte Gruppe erhielt mit Lutrol versetztes Nährmedium für 48 h. An Tag drei folgte in allen Gruppen ein Austausch des Mediums gegen frisches Nährmedium. Die Behandlung mit CoQ10, bzw. Lutrol endete somit. An Tag vier erfolgte die immunhistochemische Markierung der Retinae.

3.2.6. Übersicht über die durchgeführten Studien

Tabelle 9: Übersicht über die durchgeführten Studien der vorliegenden Dissertation

Studie	Gruppen	Kultivierungsdauer
Pilotstudie H₂O₂	Behandlung mit 300 µM H ₂ O ₂	4 Tage
Pilotstudie CoCl₂	Behandlung mit 300 µM CoCl ₂	4 Tage
iNOS-Inhibitor-Studie: H₂O₂	Behandlung mit 300 µM H ₂ O ₂ +	4 Tage
	Behandlung mit 500 µM iNOS-Inh.	8 Tage
iNOS-Inhibitor-Studie: CoCl₂	Behandlung mit 300 µM CoCl ₂ +	4 Tage
	Behandlung mit 500 µM iNOS-Inh.	8 Tage
CoQ10-Studien	Behandlung mit 300 µM H ₂ O ₂ + Behandlung mit 100 µM CoQ10	4 Tage
	Behandlung mit 300 µM H ₂ O ₂ + Behandlung mit 300 µM CoQ10	4 Tage

3.2.7. Kryokonservierung der Retinae

An Tag vier bzw. acht der Kultivierung wurden die Retinae für 15 Minuten mit 4%-igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Im Anschluss daran wurde das PFA entfernt und zur Entwässerung 1 ml 15%-ige D-Saccharose-Lösung für 15 Minuten direkt auf die Retina gegeben. Nach diesem Schritt wurde zum weiteren Wasserentzug 30 Minuten 30%ige D-Saccharose-Lösung auf die Retinae pipettiert. Im Anschluss daran wurden die Zellkultureinsätze mit den Retinae nacheinander einzeln entnommen, in eine Petrischale überführt und der Filter um die Retinae mittels eines Skalpells quadratisch ausgeschnitten, um so die Retinae mit dem Filterstück entnehmen zu können. Die Retinae wurden schließlich in Einbettmedium überführt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für weitere Analysen zwischengelagert. Bei den Proben für die qRT-PCR der Universität Tübingen wurden die Retinae ohne jegliche Behandlung in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und für diese Dissertation nicht weiter verwendet.

3.2.8. Herstellen von retinalen Querschnitten

Für die weitere Untersuchung wurden die in Einbettmedium eingefrorenen Proben am Mikrotom geschnitten. Auf jeden Objektträger wurden drei Schnitte mit einer Dicke vom 10 μm aufgebracht. Direkt nach dem Schneiden wurden die Schnitte am Mikroskop bei 20-facher Vergrößerung beurteilt. Anschließend wurden sie über Nacht getrocknet und am folgenden Tag zehn Minuten in eiskaltem Aceton fixiert, 30 Minuten getrocknet und danach bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Herstellung von retinalen Querschnitten wurde für die H_2O_2 - und CoCl_2 -Pilotstudien und die iNOS-Inhibitorstudien in Zusammenarbeit mit Frau Reiß durchgeführt.

3.2.9. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Um die Struktur der Retinae beurteilen zu können, wurden die retinalen Querschnitte mittels Hämatoxylin und Eosin angefärbt.

Hämatoxylin färbt die Nukleinsäuren und somit die Zellkerne und Ribosomen kräftig dunkelblau an. Eosin färbt das Cytoplasma, Kollagenfasern und Bindegewebe rot (Welsch 2006). Diese Färbung wurde bei allen Pilot- und iNOS-Inhibitorstudien durchgeführt. Hierzu wurde jeweils ein Objektträger von jeder verwendeten Retina mittels Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Zunächst wurden die Schnitte aufgetaut und vier Minuten in PBS rehydriert. Anschließend wurden sie drei Minuten in Hämalaun inkubiert und danach unter destilliertem Wasser solange abgespült, bis das Wasser keine blauen Rückstände mehr aufwies. Die Eosin-Färbung erfolgte im Anschluss für zwei Minuten, woraufhin die aufsteigende Alkoholreihe folgte. Hierfür werden die Schnitte zunächst kurz in 70%-iges Ethanol

eingetaucht und danach eine Minute in 96%-iges Ethanol überführt. Daraufhin folgte eine weitere Inkubation von einer Minute in 96%-igem Ethanol und danach in 100%-igem Ethanol für drei Minuten. Zum Schluss wurden die Schnitte noch für fünf Minuten in Xylol überführt. Anschließend wurden die Objektträger einzeln mit Eukitt eingedeckelt. Die Objektträger wurden über Nacht unter dem Abzug getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte bei 20-facher Vergrößerung mikroskopiert und vier Fotos pro Retina angefertigt. Zwei der Bilder lagen peripher rechts, bzw. links und jeweils eins mittig rechts und links.

3.2.10. Immunhistochemie

3.2.10.1. Immunhistochemie der retinalen Querschnitte

Bei der Immunhistochemie wird sich die Antigen-Antikörper-Bindung zu Nutze gemacht. Hierzu wird bei der indirekten Immunhistochemie ein Primärantikörper verwendet, der in der Retina an die gewünschte Struktur bindet. Der Sekundärantikörper ist z.B. Fluorescein-gekoppelt, richtet sich gegen den Primärantikörper und darf nicht vom selben Wirt stammen wie dieser.

Die Objektträger wurden aus dem Gefrierschrank entnommen, bei 37°C getrocknet und anschließend 4 Minuten in PBS rehydriert. Von den nachfolgenden Flüssigkeiten wurden 100 µl pro Objektträger verwendet. Zum Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen wurde zunächst eine Blockierlösung bestehend aus 0,1–0,2 % Triton X, 10-20 % Eselserum, 10 % Ziegen Serum und 1% bovinem Serum Albumin hergestellt und für eine Stunde auf die Schnitte pipettiert. Die Zusammensetzung der Blockierlösung richtete sich dabei nach der durchgeführten Markierung. Der Primärantikörper wurde in ebendieser Blockierlösung angesetzt (Brn-3a 1:100, NeuN 1:500, RBPMS 1:200 und HIF-1α 1:100), auf die Schnitte gegeben und über Nacht inkubiert (Tabelle 10). Die Antikörperreste wurden am folgenden Tag durch mehrfaches Auftragen von PBS in kurzen Abständen entfernt. Anschließend wurde der Sekundärantikörper in der Blockierlösung angesetzt und für eine Stunde auf die Schnitte gegeben. Nach erneutem Auftragen von PBS wurde zur Markierung der Zellkerne 4',6-Diamin-2-Phenylindol (DAPI) dazugegeben und für fünf Minuten inkubiert. Je nach verwendetem Antikörper wurden nach bis zu fünf maligem Auftragen von PBS die Objektträger mit Shandon Immumount eingedeckelt und in ein Dunkelbuch gelegt. Für die Markierung wurden pro Retina zwei Objektträger verwendet, sowie eine Negativkontrolle. Bei der anschließenden mikroskopischen Untersuchung mit dem Immunfluoreszenz-Mikroskop Axio Imager M1 von Zeiss wurden pro Schnitt vier Fotos angefertigt, wodurch sich bei drei Schnitten je Objektträger 12 Fotos pro Objektträger ergeben (Abbildung 10). Da pro Retina zwei Objektträger markiert wurden, ergaben sich 24 Aufnahmen pro Retina. Eine immunhistochemische Markierung wurde bei jeder in dieser Arbeit durchgeführten Studie angefertigt.

Der verwendete Marker Anti-NeuN aus dem Huhn markiert in der Retina sowohl die Zellen der inneren nukleären Schicht, als auch die retinalen Ganglienzellen und ist daher als unspezifischer Ganglienzellmarker anzusehen (Gusel'nikova 2015). Bei einer Zellzählung würden so auch in der Ganglienzellschicht befindliche, sog. „displaced amacrine cells“ mitgezählt werden, welche durch NeuN ebenso markiert werden wie die retinalen Ganglienzellen (Rodriguez, de Sevilla Muller et al. 2014). In dieser Arbeit wurden nur die Zellen der retinalen Ganglienzellschicht ausgezählt, wobei jedoch nicht auszuschließen ist, dass auch „displaced amacrine cells“ mitgezählt wurden. Aus diesem Grund wurden die Studien, in der NeuN als Ganglienzellmarker verwendet wurde nach Etablierung von RBPMS auf der Schweineretina erneut mit RBPMS markiert. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit zur Darstellung von hypoxischen retinalen Ganglienzellen der Marker Anti-HIF-1 α in einer Doppelmarkierung mit Anti-RBPMS auf der Schweineretina etabliert.

Tabelle 10: Darstellung der verwendeten Primärantikörper, deren Sekundärantikörper und deren Verdünnung

Struktur	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Retinale Ganglienzellen	Brn- 3a (1:100)	Esel anti Ziege Alexa 488 (1:500)
	NeuN (1:500)	Esel anti Huhn Cy3 (1:400)
	RBPMS (1:200)	Esel anti Kaninchen Alexa 555 (1:400)
Hypoxische Zellen	HIF-1 α (1:100)	Ziege anti Maus Alexa 488 (1:400)

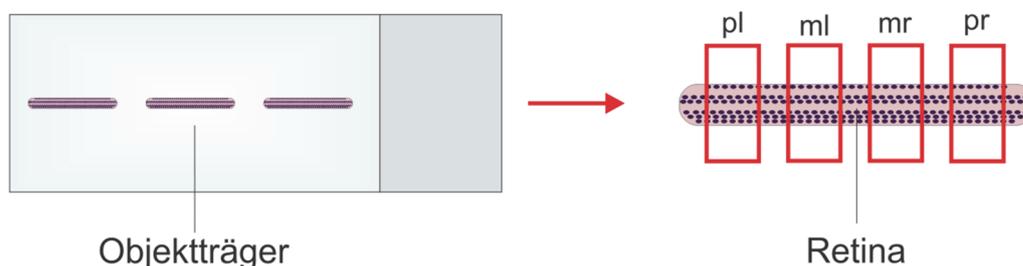


Abbildung 10: Schema der Mikroskopie der retinalen Querschnitte

Auf dem Objektträger sind drei retinale Querschnitte erkennbar. Von jedem dieser Querschnitte, wie rechts im Schema zu erkennen, wurden nach erfolgter immunhistochemischer Markierung vier Fotos zur anschließenden Zellzählung angefertigt (rote Markierung): peripher-links (pl), Mitte-links (ml), Mitte-rechts (mr) und peripher-rechts (pr).

3.2.10.2. Immunhistochemie der retinalen Flachpräparate

Bei den CoQ10-Studien wurden retinale Flachpräparate immunhistochemisch markiert. Hierzu wurde das Medium abpipettiert und für 15 Minuten durch PFA ersetzt. Danach wurden die Proben auf dem Filter nacheinander auf ein Zellstofftuch überführt. Hier wurde der Filter um die Probe quadratisch ausgeschnitten und das Filter-Quadrat mit der Probe in eine vorher beschriftete 12-Well-Platte zur immunhistochemischen Markierung überführt. Die Markierung erfolgte bei Raumtemperatur. Am ersten Tag wurden zunächst die unspezifischen Bindungsstellen mittels einer Blockierlösung bestehend aus 20% NDS und 2 % Triton X, gelöst in PBS für 90 Minuten blockiert. Hier wurden je 600 µl auf jede Probe pipettiert. Anschließend wurde die Blockierlösung abgesaugt und der primäre Antikörper, RBPMS (1:500), gelöst in Blockierlösung, über Nacht auf die Proben gegeben. Am folgenden Tag wurden die Reste des Primärantikörpers durch dreimaliges Auftragen und Absaugen von PBS für je acht Minuten entfernt. Anschließend wurde der Sekundärantikörper, Esel-anti-Kaninchen Alexa 555 (1:600), ebenfalls gelöst in Blockierlösung, auf die Retinae pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 h wurde viermal mit PBS für je acht Minuten gewaschen und abgesaugt. Im Anschluss wurde DAPI (1:10), gelöst in vollentsalztem Wasser und 0,5 % Triton X für 90 Sekunden auf die Proben gegeben. Daraufhin wurde wiederum dreimal mit PBS für je sechs Minuten gewaschen und abgesaugt. Anschließend wurde Parafilm so zugeschnitten und gefaltet, dass ein Quadrat mit einem quadratischen Loch in der Mitte entstand. Dieses wurde dann auf einen SuperFrost Objektträger plaziert und die Retinaprobe vorsichtig in die Aussparung des Parafilms überführt, um die Retina schließlich mit ImmuMount einzudeckeln. Nur so konnte gesichert werden, dass die Retinaprobe beim Auftragen des flüssigen ImmuMounts auf dem Objektträger haften blieb. Noch am gleichen Tag wurden die Proben mikroskopiert. Es wurden neun Bilder pro Retina aufgenommen (Abbildung 11).

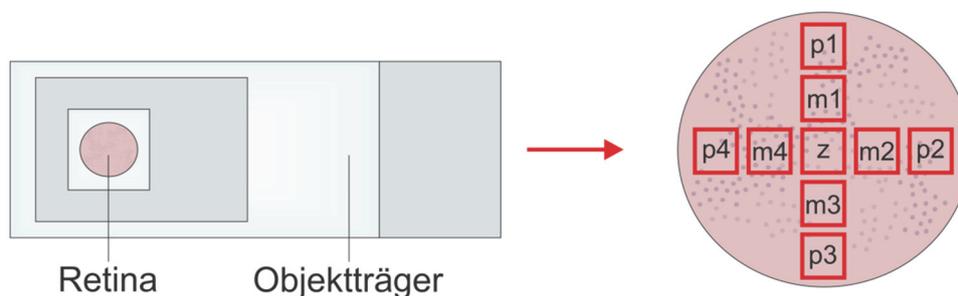


Abbildung 11: Schema der Mikroskopie der retinalen Flachpräparate

Nach immunhistochemischer Markierung wurden am Mikroskop pro Retina-Probe neun Fotos zur anschließenden Zellzählung aufgenommen: zentral (z), Mitte 1 (m1), peripher 1 (p1), Mitte 2 (m2), peripher 2 (p2), Mitte 3 (m3), peripher 3 (p3), Mitte 4 (m4) und peripher 4 (p4).

3.2.10.3. Auswertung der Immunhistochemie

3.2.10.3.1. Markieren und Schneiden der immunhistochemischen Aufnahmen

Nachdem die Bilder aufgenommen und unter dem Namen der Probe gespeichert wurden, wurden die Fotos zunächst maskiert. Dies diente der unvoreingenommenen Auswertung der Studien. Die maskierten Bilder wurden danach mittels Zen 2012 in TIFF Dateien konvertiert und anschließend mittels Corel PaintShop Pro X8 einheitlich zugeschnitten. Die Größe des Schnittfensters variierte dabei je nach durchgeführter immunhistochemischer Markierung (Tabelle 11). Die Bilder der retinalen Flachpräparate behielten ihre Originalgröße.

Tabelle 11: Darstellung der Größe des Schnittfensters der unterschiedlichen Färbungen

Immunhistochemische Färbung	Schnittfenster (Pixel)
Brn-3a	700 x 600
NeuN	600 x 800
RBPMs	600 x 800
HIF-1 α	600 x 800

3.2.10.3.2. Zellzählung mittels ImageJ

Nachdem die Bilder maskiert und zugeschnitten waren, wurde die Zellzählung mittels der Software ImageJ durchgeführt. Als positiv gefärbte Zellen wurden diejenigen angesehen, bei denen sowohl das Signal für den betreffenden Marker, als auch das DAPI Signal deutlich zu erkennen war. Nach Beendigung der Zellzählung wurden die Dateinamen demaskiert und ein Mittelwert der ausgezählten Zellen pro Probe gebildet.

3.2.10.3.3. Statistische Auswertung

Bei der statistischen Auswertung wurden die einzelnen Gruppen der Studien mittels der Software Statistica miteinander verglichen. Bei den Pilotstudien (n=6/Gruppe), in denen zwei Gruppen miteinander verglichen wurden, wurde ein t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Bei den iNOS-Studien, sowie den CoQ10-Studien wurde jeweils eine einfaktorielle ANOVA mit anschließendem Tukey Test post hoc durchgeführt. Die Signifikanzen wurden wie folgt angezeigt: p-Werte unter 0,05 (*), p<0,01 (**), und bei p<0,001 (***).

4. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Dissertation sollte zunächst die neuroprotektive Wirkung des iNOS-Inhibitors 1400W an porcinen Retinae in der Organkultur nach H₂O₂ bzw. CoCl₂ induzierter Degeneration getestet werden. Der Inhibitor sollte hierbei den potentiell durch das Enzym iNOS ausgelösten Schaden der retinalen Ganglienzellen minimieren. Aufgrund zuvor durchgeführter Studien des Experimental Eye Research Institutes in Bochum wurde eine Kultivierungsdauer von vier bzw. acht Tagen festgelegt. Die Schädigung mit H₂O₂ oder CoCl₂ fand jeweils am ersten Tag der Kultivierung statt. Ebenso am ersten Tag erfolgte die Behandlung mit dem iNOS-Inhibitor für 72 h.

Zunächst wurde jeweils eine Pilotstudie mit H₂O₂ oder CoCl₂ allein zur Verifizierung der bereits etablierten Modelle des Experimental Eye Research Institutes in Bochum durchgeführt. H₂O₂ führte durch Auslösung von oxidativem Stress u.a. zu einem Verlust der retinalen Ganglienzellen. Auch eine Behandlung mit CoCl₂ resultierte durch hypoxische Mechanismen im Zelltod der retinalen Ganglienzellen (Hurst 2017; Kuehn 2017). Nach Verifizierung dieser Ergebnisse konnten die Neuroprotektionsstudien mit dem iNOS-Inhibitor gestartet werden. Zur Auswertung wurden retinale Flachpräparate immunhistochemisch gefärbt.

Als weiteres potentielles Neuroprotektivum wurde das Antioxidans Coenzym Q10 eingesetzt. In diesen Studien wurde eine Kultivierungsdauer von vier Tagen angesetzt. CoQ10 sollte in den vorliegenden Studien den durch H₂O₂ ausgelösten oxidativen Stress minimieren.

4.1. Analysen im Modell des oxidativen Stresses

4.1.1. Untersuchung der Wirkung von H₂O₂ auf die retinalen Ganglienzellen

In dieser Pilotstudie wurden eine Kontrollgruppe und eine mit H₂O₂ behandelte Gruppe nach achttägiger Kultivierung und anschließender immunhistochemischer Markierung mittels Anti-Brn3a untersucht.

Das Ergebnis bestätigte die der vorangegangenen Untersuchungen (Hurst 2017). Die mit H₂O₂ behandelte Gruppe wies mit einem Mittelwert von 10,77±3,77 Brn-3a⁺-Zellen/mm (p=0,0002) signifikant weniger Zellen auf als die Kontrollgruppe mit einem Mittelwert von 25,01±3,39 Brn-3a⁺-Zellen/mm (Abb.12 B). Somit konnte der Ganglienzellverlust durch H₂O₂ verifiziert werden und das Modell für nachfolgende Studien weiterverwendet werden.

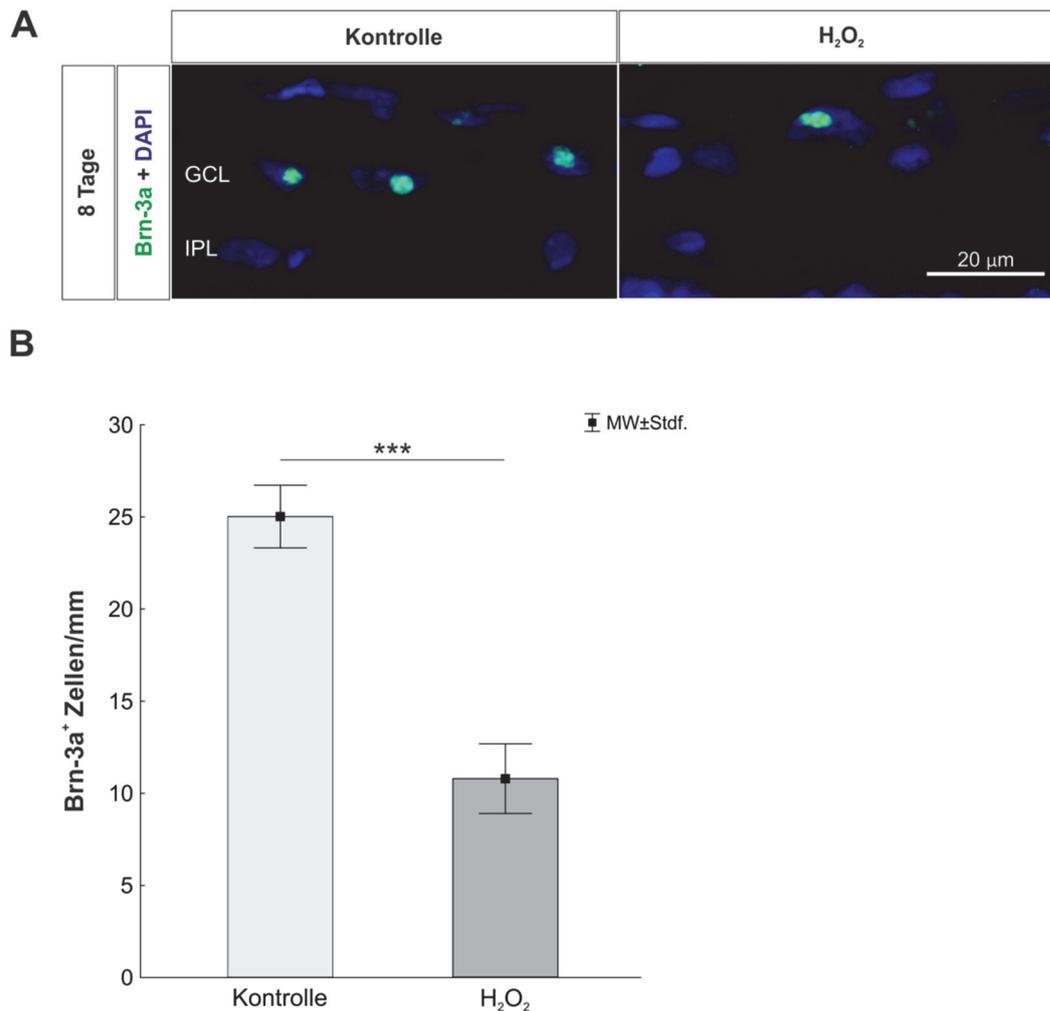


Abbildung 12: Signifikanter Zelluntergang der retinalen Ganglienzellen nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid

A) Nach Behandlung mit 300 μM H_2O_2 wurden nach acht Tagen die retinalen Ganglienzellen immunhistochemisch mit anti-Brn-3a (grün) und die Zellkerne mit DAPI (blau) markiert. **B)** Die Zellzählung ergab nach statistischer Auswertung einen signifikanten Verlust der RGZ in der mit H_2O_2 behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. $N=6/\text{Gruppe}$. Abkürzungen: GCL=Ganglienzellschicht, IPL=innere plexiforme Schicht, $***p<0.001$, Maßstab=20 μm .

4.1.2. Untersuchung der Wirkung des iNOS-Inhibitors im Modell des oxidativen Stresses

Nachdem in der Pilotstudie der Ganglienzellverlust durch H_2O_2 nachgewiesen und somit die Ergebnisse des etablierten Modells verifiziert werden konnten, wurde das Modell verwendet, um die potentiell protektive Wirkung des iNOS-Inhibitors 1400W zu testen.

Die Kultivierung erfolgte sowohl vier als auch acht Tage ($n=10/\text{Gruppe}$).

4.1.2.1. Intakte retinale Schichtung nach vier und acht Tagen Kultivierung

Diese Färbung wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob die retinale Schichtung nach der Kultivierung erhalten war. Es stellte sich heraus, dass die Retinae sowohl nach vier- als auch nach achttägiger Kultivierung eine unveränderte Schichtung aufwiesen und somit für die immunhistochemische Markierung verwendet werden konnten (Abb. 13).

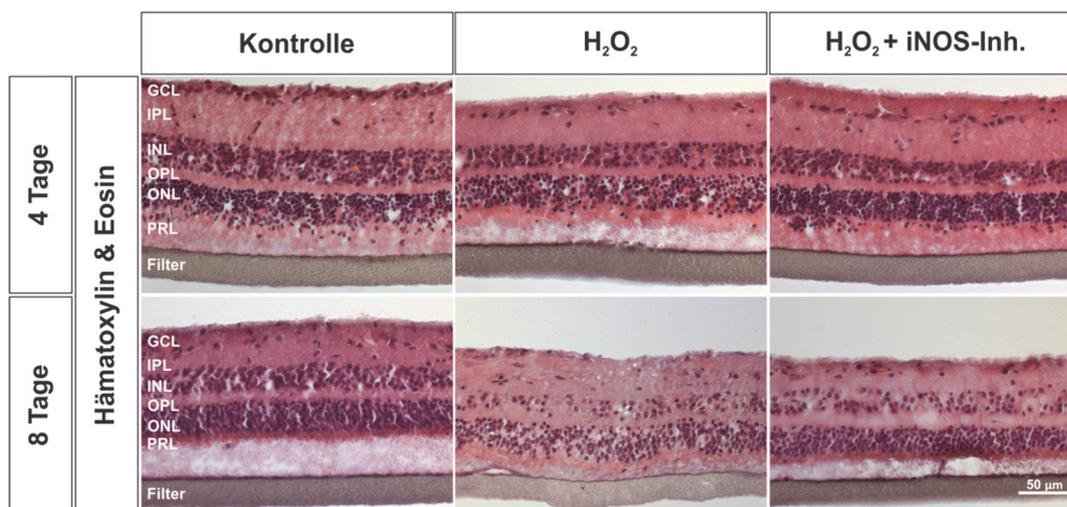


Abbildung 13: Unveränderte retinale Schichtung nach vier und acht Tagen Kultivierung

Die retinale Schichtung war sowohl nach vier als auch nach acht Tagen Kultivierung in allen Gruppen erhalten. Abkürzungen: GCL= Ganglienzellschicht, IPL= innere plexiforme Schicht, INL= innere Körnerschicht, OPL= äußere plexiforme Schicht, ONL= äußere plexiforme Schicht, PRL= Photorezeptorschicht, Maßstab: 50 µm.

4.1.2.2. Untersuchung der Protektion retinaler Neurone vor oxidativem Stress durch den iNOS-Inhibitor

Die Ergebnisse dieser Untersuchung beziehen sich auf die viertägige Kultivierung der iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses.

In der mit H_2O_2 behandelten Gruppe konnten mit $21,35 \pm 1,44$ NeuN⁺-Zellen/mm deutlich weniger Zellen dargestellt werden, als in der Kontrollgruppe mit $33,28 \pm 1,35$ NeuN⁺-Zellen/mm ($p=0,004$). Die somit nachgewiesene deutliche Degeneration der neuronalen Zellen durch H_2O_2 bestätigt erneut die Ergebnisse der Pilotstudie (s. Abschnitt 3.1.1.). Die mit H_2O_2 + iNOS-Inhibitor behandelte Gruppe zeigte signifikant mehr Zellen ($29,51 \pm 3,16$ NeuN⁺-Zellen/mm) als die H_2O_2 -Gruppe ($p=0,04$). Somit konnte durch den iNOS-Inhibitor eine Protektion der retinalen Ganglienzellen hervorgerufen werden. Der schützende Effekt des iNOS-Inhibitors war so stark, dass zwischen der Kontrollgruppe und der mit H_2O_2 + iNOS-

Inhibitor behandelten Gruppe kein statistischer Unterschied mehr zu erkennen war ($p=0,45$, Abb.14B).

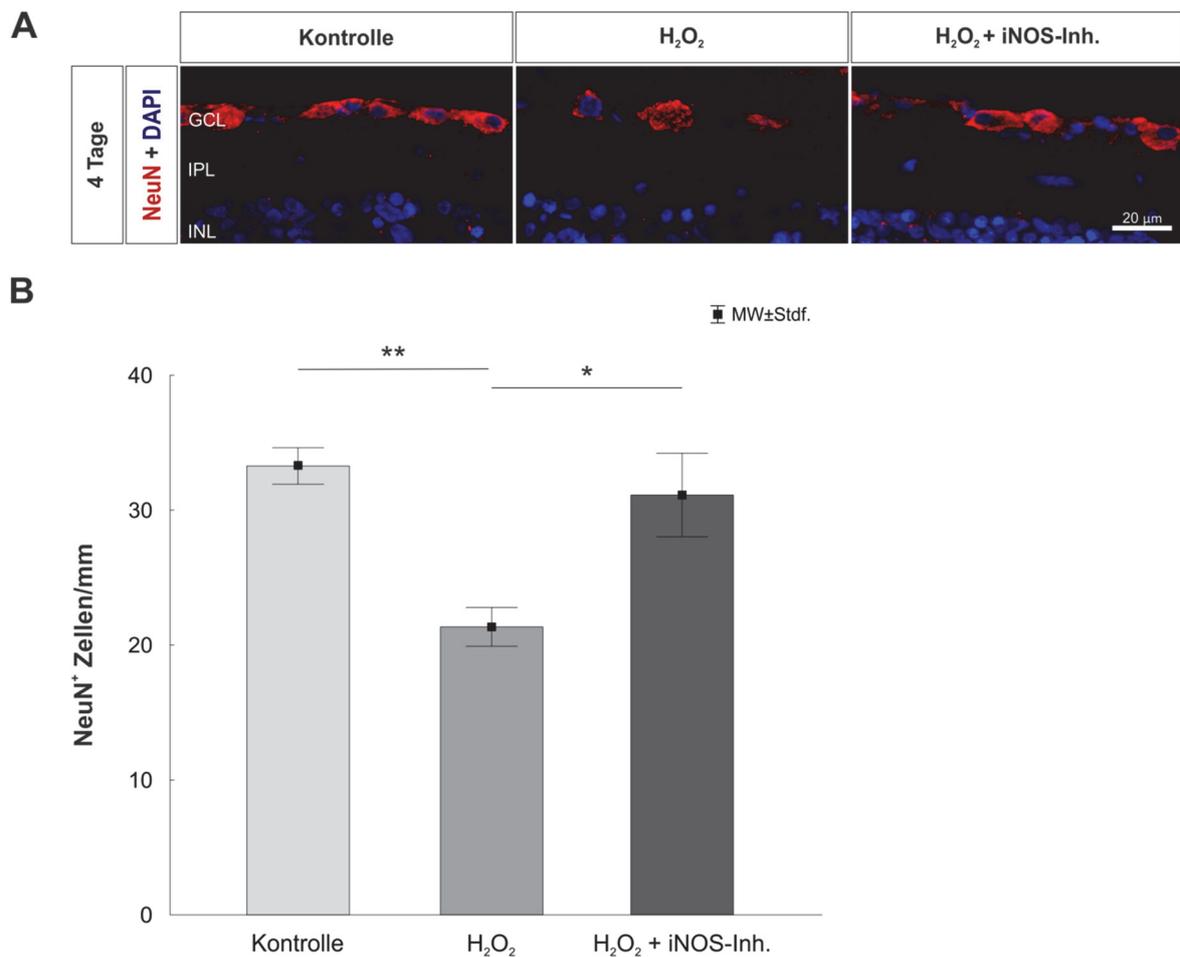


Abbildung 14: Signifikanter Schutz der retinalen Ganglienzellen gegen oxidativen Stress durch den iNOS-Inhibitor 1400W nach vier Tagen

A) Neuronale Zellen wurden nach viertägiger Kultivierung mittels anti-NeuN (rot) markiert. Die Zellkerne wurden mittels DAPI (blau) sichtbar gemacht. **B)** Nach Zellzählung und statistischer Auswertung konnte ein signifikanter Verlust der RGZ in der mit H₂O₂ behandelten Gruppe in Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Der iNOS-Inhibitor führte zu einer signifikanten Protektion der RGZ gegen oxidativen Stress. N=6/Gruppe, Abkürzungen: GCL=Ganglienzellschicht, IPL= innere plexiforme Schicht, INL= innere Körnerschicht, * $p<0,05$, ** $p<0,01$. Maßstab= 20µm.

4.1.2.3. Kolokalisation des retinalen Ganglienzellmarkers und HIF-1 α

Um die positiven Ergebnisse der NeuN-Färbung mit einem selektiven Ganglienzellmarker verifizieren zu können wurde der retinalen Ganglienzell-Marker RBPMS in einer Doppelmarkierung mit HIF-1 α auf der Schweineretina etabliert. Die Markierung mit RBPMS (rot) stellte die retinalen Ganglienzellen in der Ganglienzellschicht selektiv dar. Darüber hinaus konnten mittels Anti- HIF-1 α (grün) die hypoxischen Zellkerne dargestellt werden. Diese

immunhistochemische Doppelmarkierung wurde nicht statistisch ausgewertet. Eine Doppelmarkierung der retinalen Ganglienzellen mit Anti-RBPMS und Anti- HIF-1 α ist anhand weißer Pfeile in Abbildung 15 gekennzeichnet.

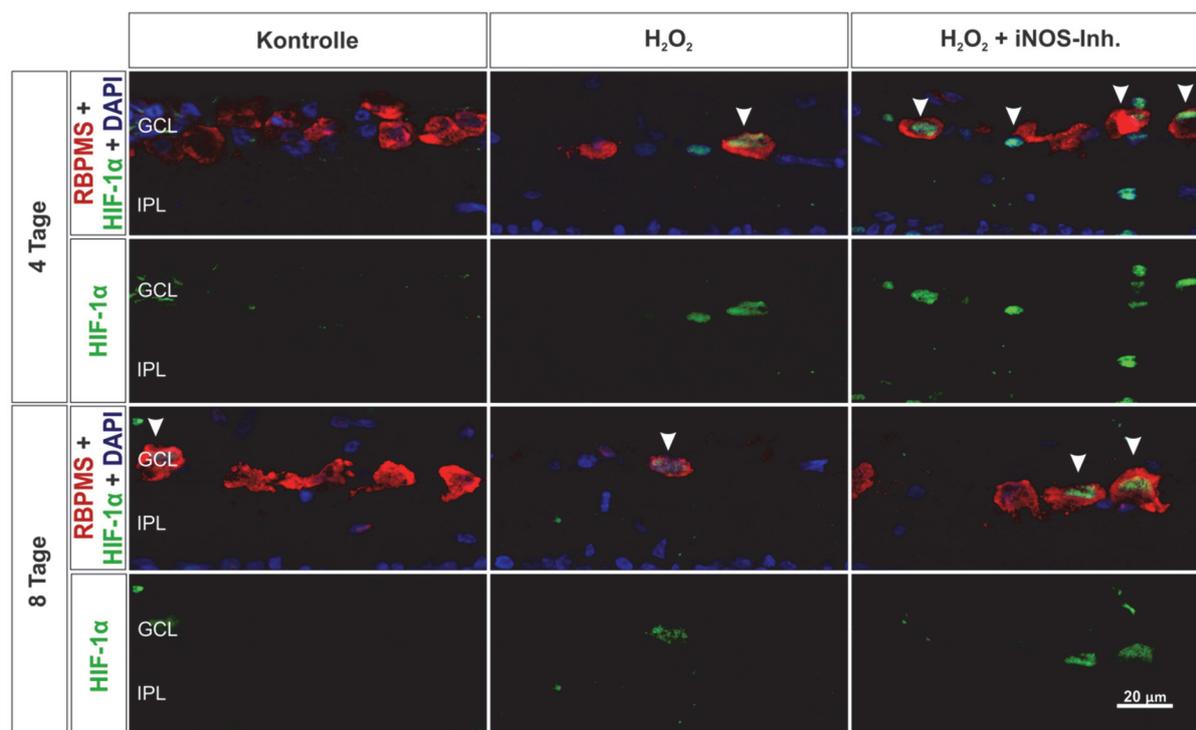


Abbildung 15: Doppelmarkierung von RBPMS und HIF-1 α im Modell des oxidativen Stresses
Darstellung der Doppelmarkierung von RBPMS und HIF-1 α in der iNOS-Inhibitor-Studie im Modell des oxidativen Stresses, sowohl nach vier als auch nach acht Tagen Kultivierung. Die RGZ sind mit RBPMS (rot) markiert worden. HIF-1 α (grün) stellt die hypoxischen Zellen dar. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) dargestellt. Eine Kolokalisation beider Signale ist mittels der weißen Pfeile gekennzeichnet. GCL=Ganglienzellschicht, IPL=innere plexiforme Schicht. Maßstab= 20 μ m.

4.1.2.4. Untersuchung der Protektion retinaler Ganglienzellen vor oxidativem Stress durch den iNOS-Inhibitor

Um die potentiell protektiven Effekte des iNOS-Inhibitors mit einem ganglienzellspezifischen Marker zu analysieren, wurden die retinalen Ganglienzellen nach vier und acht Tagen mit anti-RBPMS markiert. Dabei zeigte die mit H₂O₂ behandelte Gruppe mit 20,92 \pm 1,99 RBPMS⁺-Zellen/mm signifikant weniger Zellen als die Kontrollgruppe mit 41,46 \pm 2,18 RBPMS⁺-Zellen/mm ($p=0,0001$) nach vier Tagen Kultivierung. Dahingegen zeigte sich, dass der iNOS-Inhibitor zu einer signifikanten Protektion der retinalen Ganglienzellen gegen den durch H₂O₂ ausgelösten oxidativen Stress führte (Abbildung 16B). Die Zellzahl der mit H₂O₂ + iNOS-Inhibitor behandelten Gruppe betrug 35,22 \pm 2,42 RBPMS⁺-Zellen/mm. Wobei diese im Vergleich zur mit H₂O₂ behandelten Gruppe deutlich mehr Zellen aufwies ($p=0,0005$). Zwischen der Kontrollgruppe und der mit H₂O₂ + iNOS-Inhibitor behandelten Gruppe zeigte sich keine Signifikanz.

Nach acht Tagen betrug der Mittelwert der Kontrollgruppe $35,89 \pm 2,60$ RBPMS⁺-Zellen/mm. Im Vergleich dazu kam es in der mit H₂O₂- behandelten Gruppe zu einem signifikanten Verlust der retinalen Ganglienzellen auf $23,95 \pm 2,30$ RBPMS⁺-Zellen/mm ($p=0,005$). Die Zellzahl der mit H₂O₂ + iNOS-Inhibitor behandelten Gruppe betrug in dieser Studie $30,82 \pm 2,41$ RBPMS⁺-Zellen/mm. Somit gab es in diesem Fall weder einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ($p=0,32$), noch zur mit H₂O₂ behandelten Gruppe ($p=0,13$). Die retinalen Ganglienzellen konnten demnach durch den iNOS-Inhibitor vor oxidativem Stress geschützt werden.

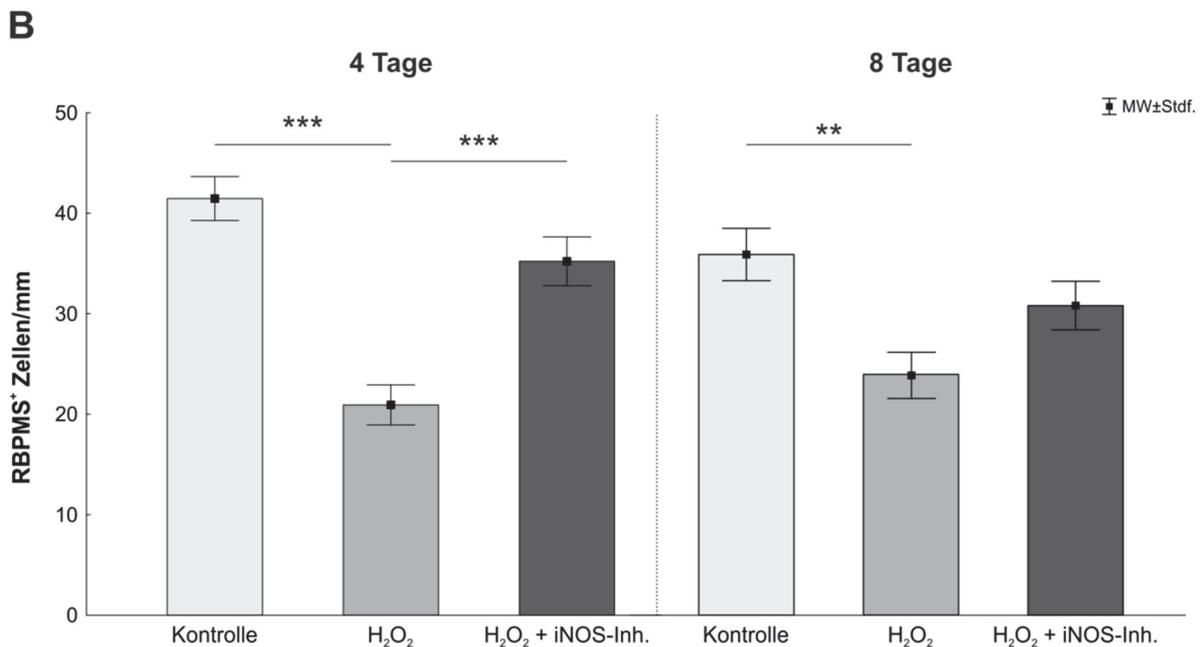
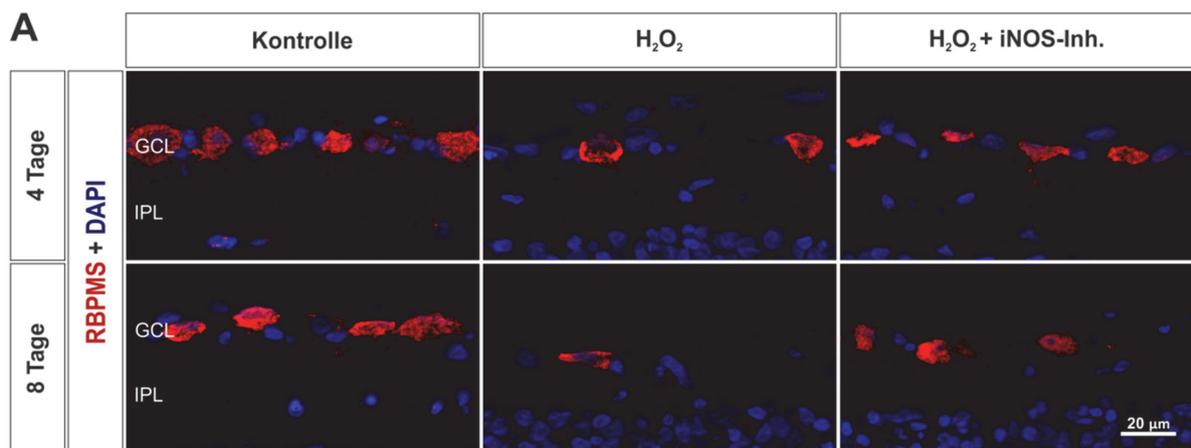


Abbildung 16: Schutz der retinalen Ganglienzellen vor oxidativem Stress durch den iNOS-Inhibitor

A) Markierung der RGZ mit anti-RBPMS (rot). DAPI markiert die Zellkerne (blau). **B)** Nach vier und acht Tagen kam es zu einem signifikanten Untergang der RGZ durch H₂O₂ im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der iNOS-Inhibitor schützte jedoch die RGZ vor oxidativem Stress nach vier und acht Tagen.

*N=9-10/Gruppe/Zeitpunkt. Abkürzungen: GCL=Ganglienzellschicht, IPL=innere plexiforme Schicht, INL=innere Körnerschicht. **p<0,01; ***p<0,001. Maßstab: 20 µm.*

4.2. Analysen im Hypoxiemodell

4.2.1. Untersuchung der Degeneration retinaler Ganglienzellen durch CoCl₂

In vorliegender Arbeit wurde für diese Pilotstudie die Kultivierung und das Aufschneiden der Proben am Mikrotom in Zusammenarbeit mit der Bachelorstudentin Fabienne Reiß durchgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchung der Degeneration retinaler Ganglienzellen durch CoCl₂ sind Bestandteil der Bachelorarbeit von Fabienne Reiß (Reiß 2018).

4.2.2. Untersuchung der Protektion retinaler Neurone durch den iNOS-Inhibitor vor Hypoxie

Die Ergebnisse der Anti-NeuN-Markierung sind ebenfalls in der Bachelorarbeit von Fabienne Reiß enthalten (Reiß 2018). In dieser Studie wurde ebenso die Kultivierung und das Aufschneiden der Proben am Mikrotom in Zusammenarbeit mit Frau Reiß durchgeführt. Die entstandenen Schnitte der kultivierten Retinae wurden dann für eigenständige immunhistochemische Studien und HE-Färbungen genutzt. Die Ergebnisse der Anti-RBPMS-Markierung sind in folgenden Abschnitten dieser Arbeit dargestellt.

4.2.2.1. Intakte retinale Schichtung nach vier und acht Tagen Kultivierung

Auch in dieser Studie wurde zur Kontrolle des Erhaltes der retinalen Schichtung eine Hämatoxylin und Eosin Färbung angefertigt. Sowohl nach vier-, als auch nach acht Tagen Kultivierung konnte eine intakte retinale Schichtung bei allen verwendeten Retinae nachgewiesen werden. Beispielhafte Bilder von jeder Gruppe sind in Abbildung 17 dargestellt.

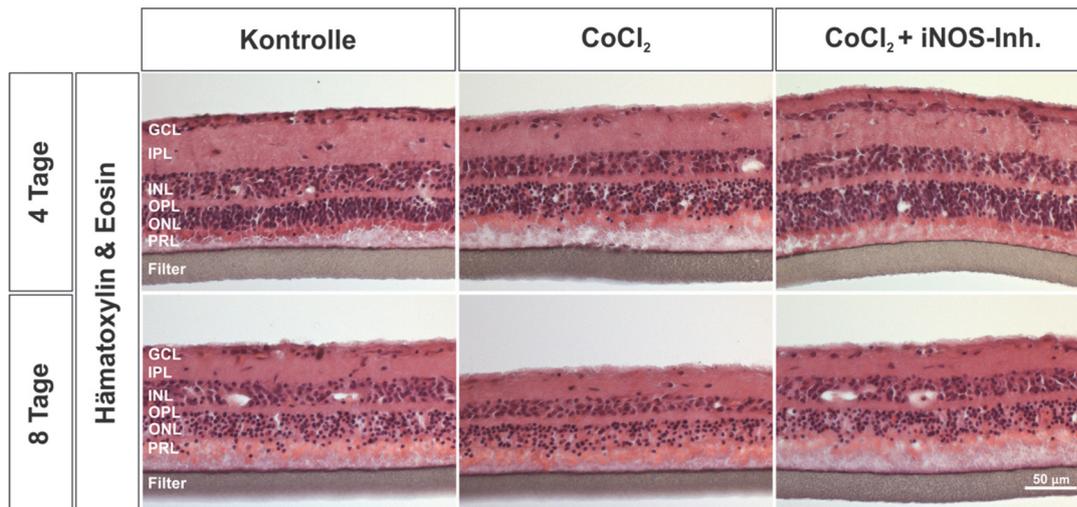


Abbildung 17: Unveränderte retinale Schichtung nach vier und acht Tagen Kultivierung

In allen untersuchten Gruppen war die retinale Schichtung sowohl nach vier als auch nach acht Tagen erhalten. GCL= Ganglienzellschicht, IPL= innere plexiforme Schicht, INL= innere Körnerschicht, OPL= äußere plexiforme Schicht, ONL= äußere Körnerschicht, PRL= Photorezeptorschicht.

Maßstab: 50 µm.

4.2.2.2. Kolokalisation des retinalen Ganglienzellmarkers und HIF-1α

Wie zuvor im Modell des oxidativen Stresses wurde auch hier eine Doppelmarkierung von anti-RBPMS und anti- HIF-1α durchgeführt.

Auch in diesem Modell konnten die retinalen Ganglienzellen selektiv in der Ganglienzellschicht mittels RBPMS (rot) dargestellt werden. Die hypoxischen Zellkerne stellten sich durch HIF-1α mit entsprechendem Sekundärantikörper grün dar (Abb. 18). Statistisch wurde diese immunhistochemische Doppelmarkierung nicht untersucht. Eine Doppelmarkierung der retinalen Ganglienzellen mit anti-RBPMS und anti- HIF-1α ist anhand weißer Pfeile in Abbildung 18 gekennzeichnet.

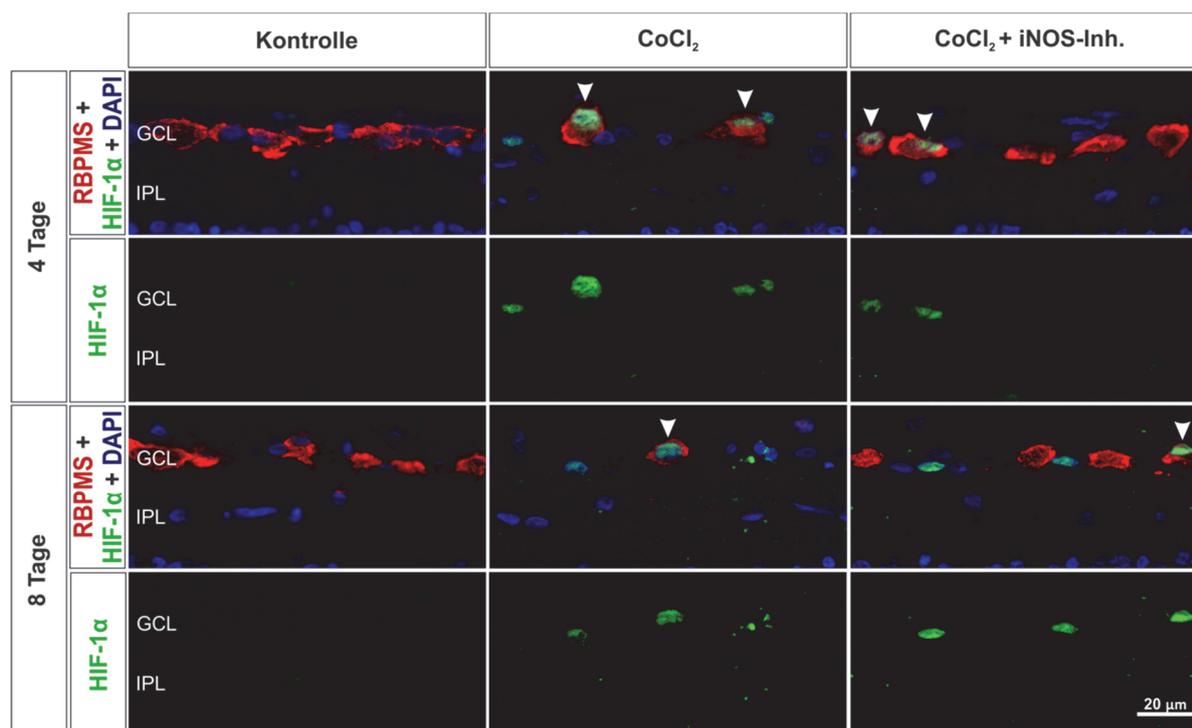


Abbildung 18: Doppelmarkierung von RBPMS und HIF-1 α im Hypoxiemodell

Darstellung der Doppelmarkierung von RBPMS und HIF-1 α in der iNOS-Inhibitor-Studie im Hypoxiemodell, sowohl nach vier, als auch nach acht Tagen Kultivierung. Auch in dieser Studie ist eine Kolokalisation (Pfeile) von RBPMS (rot) und HIF-1 α (grün) erkennbar. DAPI markiert wiederum die Zellkerne in blau. GCL=Ganglienzellschicht, IPL=innere plexiforme Schicht. Maßstab: 20 μ m.

4.2.3. Untersuchung der Protektion retinaler Ganglienzellen vor Hypoxie durch den iNOS-Inhibitor

In folgendem Abschnitt werden die Ergebnisse der iNOS-Inhibitorstudie im Hypoxiemodell sowohl nach vier als auch nach acht Tagen Kultivierung und Färbung mit Anti-RBPMS dargestellt.

Nach vier Tagen zeigte die mit CoCl₂ behandelte Gruppe mit $25,61 \pm 2,56$ RBPMS⁺-Zellen/mm im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $40,00 \pm 1,04$ RBPMS⁺-Zellen/mm einen signifikanten Zellverlust ($p=0,0002$). Eine starke Neuroprotektion wurde in der mit CoCl₂ + iNOS-Inhibitor behandelten Gruppe mit $33,91 \pm 2,21$ RBPMS⁺-Zellen/mm im Vergleich zur mit CoCl₂ behandelten Gruppe deutlich ($p=0,02$). Die Kontrollgruppe und die mit CoCl₂ + iNOS-Inhibitor behandelte Gruppe zeigten keinen signifikanten Unterschied ($p=0,10$).

Nach acht Tagen zeigten sich ähnliche Ergebnisse. In der Kontrollgruppe waren mit $31,79 \pm 2,03$ RBPMS⁺-Zellen/mm die meisten retinalen Ganglienzellen vorhanden. Die mit CoCl₂ behandelte Gruppe wies mit $19,46 \pm 0,90$ RBPMS⁺-Zellen/mm signifikant weniger Zellen auf ($p=0,0001$). Der iNOS-Inhibitor führte auch nach acht Tagen zu einer signifikanten Protektion der retinalen Ganglienzellen ($p=0,002$). In dieser Gruppe wurden $28,54 \pm 1,89$

RBPMs⁺-Zellen/mm gezählt. Die mit CoCl₂ + iNOS-Inhibitor behandelte Gruppe zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (p=0,37, Abb.18B).

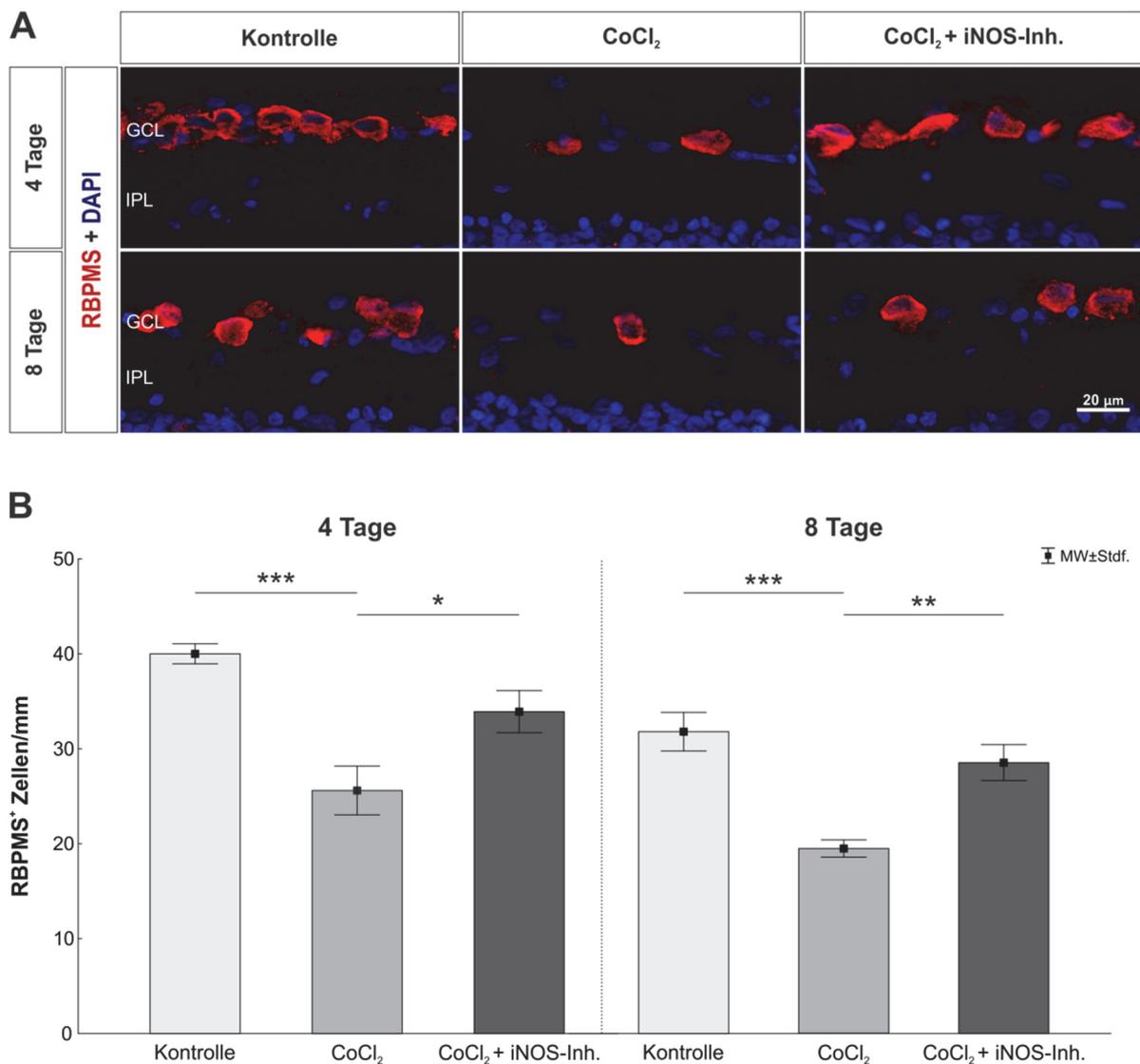


Abbildung 19: Signifikanter Schutz der retinalen Ganglienzellen gegen Hypoxie durch den iNOS-Inhibitor

A) Um die potentielle Protektion der RGZ vor Hypoxie durch den iNOS-Inhibitor zu untersuchen, wurden diese mittels anti-RBPMs (rot) markiert. Mit DAPI wurden die Zellkerne in blau dargestellt. **B)** Nach vier Tagen zeigte sich ein signifikanter Untergang der RGZ durch Zugabe von CoCl₂. Der iNOS-Inhibitor führte zu einer Protektion der RGZ vor Hypoxie. Auch in der acht-Tage-Studie führte der iNOS-Inhibitor zu einer Protektion der RGZ, wobei CoCl₂ zu einem deutlichen Verlust der RGZ im Vergleich zur Kontrollgruppe führte. N=10/Gruppe. Abkürzungen: GCL=Ganglienzellschicht, IPL=innere plexiforme Schicht. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Maßstab= 20µm.

4.3. Untersuchung der Protektion retinaler Ganglienzellen durch Coenzym Q10 vor oxidativem Stress

4.3.1. Untersuchung der Protektion durch 100 μ M Coenzym Q10

Nach immunhistochemischer Markierung der retinalen Flachpräparate mittels Anti-RBPMS und anschließender Zellzählung, konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von 100 μ M CoQ10 zu keinerlei Protektion der retinalen Ganglienzellen führte. Die Kontrollgruppe wies mit $580,48 \pm 73,75$ RBPMS⁺-Zellen/mm² die meisten Zellen auf. Signifikant weniger Zellen konnten in der mit H₂O₂ behandelten Gruppe mit $323,85 \pm 13,61$ RBPMS⁺-Zellen/mm² dargestellt werden ($p=0,01$). Die mit CoQ10 behandelte Gruppe zeigte $313,93 \pm 58,53$ RBPMS⁺-Zellen/mm², demnach kam es zu einem signifikanten Verlust der retinalen Ganglienzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,01$). Die mit Lutrol behandelte Gruppe zeigte mit $438,15 \pm 35,14$ RBPMS⁺-Zellen/mm² keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ($p=0,24$, Abb. 20B).

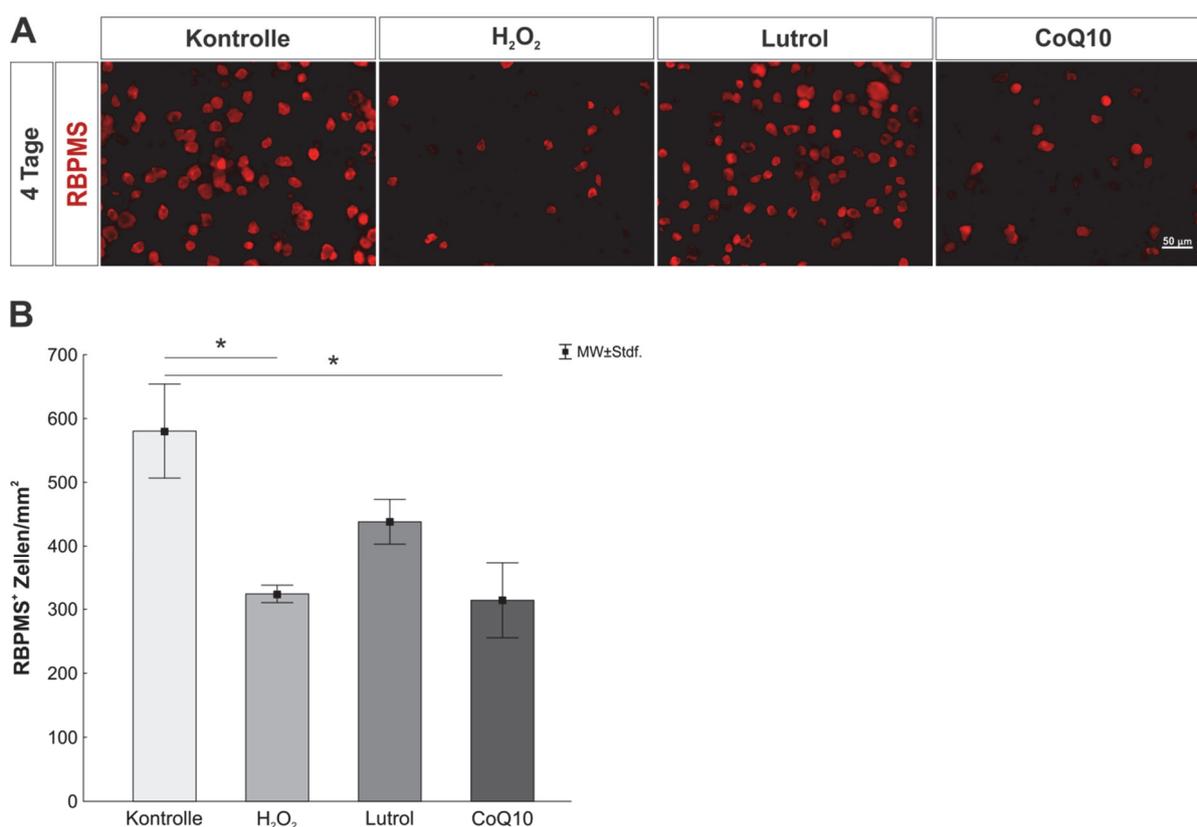


Abbildung 20: Keine Protektion der retinalen Ganglienzellen vor oxidativem Stress durch 100 μ M CoQ10

A) Zur Untersuchung der potentiellen Protektion der RGZ durch CoQ10 wurden die untersuchten Retinae als Flachpräparate mittels anti-RBPMS (rot) markiert. **B)** Nach statistischer Auswertung der Zellzählung konnte ein signifikanter Untergang der RGZ in der mit H₂O₂ behandelten Gruppe im

Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Auch die mit CoQ10 behandelte Gruppe führte zu einem signifikanten Zelluntergang. In der mit Lutrol behandelten Gruppe wurden zwar weniger Zellen als in der Kontrollgruppe nachgewiesen, dennoch zeigte sich kein signifikanter Unterschied. $N=4-5/Gruppe$. $*p<0,05$. Maßstab: $50\ \mu\text{m}$.

4.3.2. Untersuchung der Protektion durch $300\ \mu\text{M}$ Coenzym Q10

Da der Einsatz von $100\ \mu\text{M}$ CoQ10 die retinalen Ganglienzellen nicht vor oxidativem Stress schützen konnte, wurde noch eine höhere Konzentration von CoQ10 ($300\ \mu\text{M}$) im selben Versuchsaufbau getestet.

Wie in Abbildung 21 zu erkennen, zeigte die mit Lutrol behandelte Gruppe mit $577,29\pm 57,22$ RBPMS⁺-Zellen/ mm^2 keinen statistischen Unterschied zur Kontrollgruppe mit $459,885\pm 88,15$ RBPMS⁺-Zellen/ mm^2 ($p=0,59$). Einen geringen Unterschied zeigten die Kontrollgruppe verglichen mit der mit H_2O_2 behandelten Gruppe ($p=0,84$). Die mit CoQ10 behandelte Gruppe wies mit $404,44\pm 46,42$ RBPMS⁺-Zellen/ mm^2 keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ($p=0,91$) oder mit Lutrol behandelten Gruppe ($p=0,59$) auf.

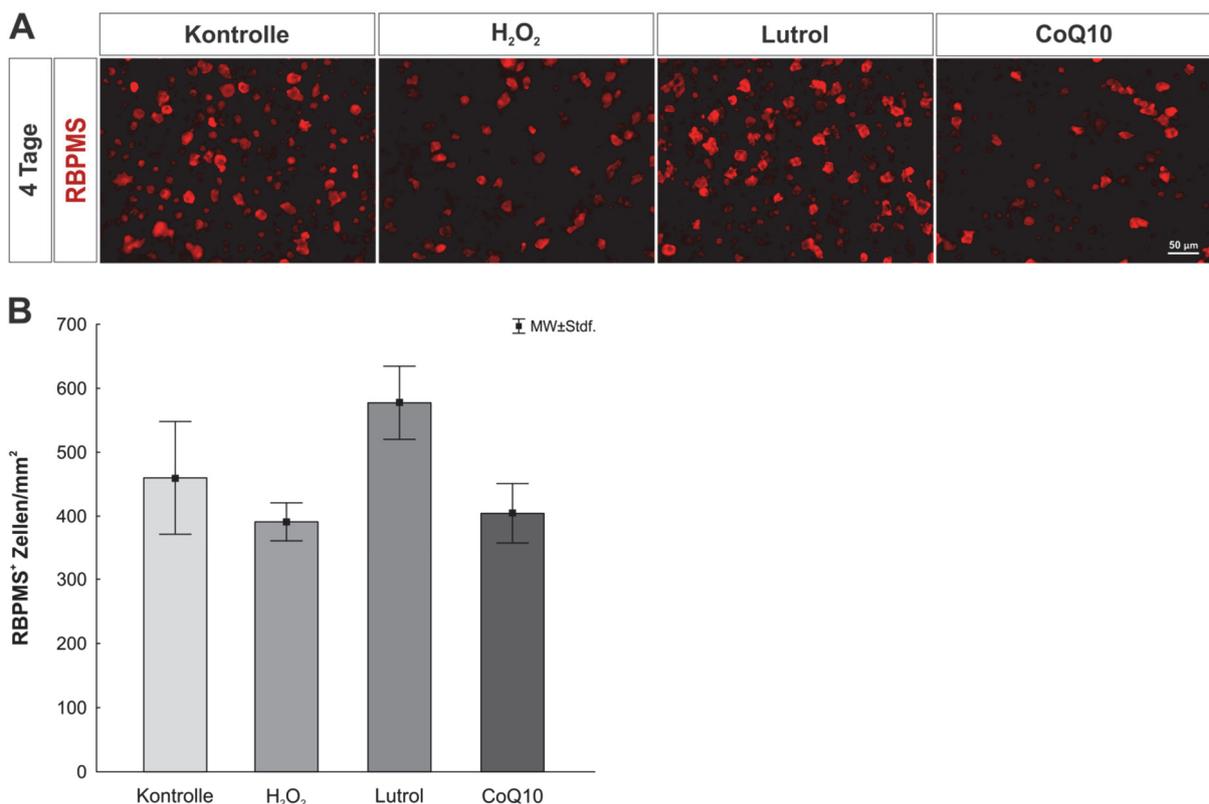


Abbildung 21: Keine Protektion der retinalen Ganglienzellen vor oxidativem Stress durch $300\ \mu\text{M}$ CoQ10

A) Zur Untersuchung der potentiellen Protektion der RGZ vor oxidativem Stress durch CoQ10 wurden die RGZ mit Anti-RBPMS (rot) markiert. **B)** Die mit Lutrol behandelte Gruppe und die Kontrollgruppe wiesen die meisten RGZ auf, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen

nachweisbar waren. Die Behandlung mit 300 μ M CoQ10 führte zu keinem signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe, zur mit H_2O_2 behandelten Gruppe und zur Lutrol-Gruppe. Somit erfolgte auch keine Protektion vor oxidativem Stress durch H_2O_2 . N=4-5/Gruppe. Maßstab: 50 μ m.

5. Diskussion

Um retinale Erkrankungen, wie z.B. das Glaukom nicht nur symptomatisch behandeln zu können, sind neue Therapieansätze nötig. Zwei vielversprechende neuroprotektive Therapeutika sind der iNOS-Inhibitor 1400W und Coenzym Q10. In einem ersten Ansatz wurde der iNOS-Inhibitor auf der Grundlage zweier etablierter Modelle, dem Modell des oxidativen Stresses (Hurst 2017) und dem Hypoxiemodell (Kuehn 2017) auf der Schweineretina-Organkultur getestet. Die Behandlung mit H_2O_2 bzw. mit $CoCl_2$ induzierte hierbei einen Untergang der retinalen Ganglienzellen und ahmte somit u.a. die Mechanismen der Pathogenese des Glaukoms nach.

Oxidativer Stress, chemisch ausgelöst durch Wasserstoffperoxid, führte sowohl nach vier als auch nach acht Tagen zu einem signifikanten Verlust der retinalen Ganglienzellen. Der iNOS-Inhibitor zeigte seine neuroprotektive Wirkung nach vier Tagen.

$CoCl_2$ induzierte eine chemische Hypoxie und führte dadurch zu einem Untergang der retinalen Ganglienzellen zu beiden untersuchten Zeitpunkten. Sowohl nach vier als auch nach acht Tagen führte der iNOS-Inhibitor zu einer Protektion der retinalen Ganglienzellen vor hypoxischen Schäden.

Im Gegensatz dazu konnte die Schädigung der retinalen Ganglienzellen mit H_2O_2 durch Coenzym Q10 nicht aufgehoben werden. Die retinalen Ganglienzellen gingen trotz der Behandlung mit CoQ10 unter.

5.1. Degeneration der retinalen Ganglienzellen durch H_2O_2

H_2O_2 ist ein wichtiger Regulator verschiedener Signalwege in der Zelle. Unterschiedliche Stimuli, wie z.B. Zytokine oder Wachstumsfaktoren, führen zu einer gesteigerten Bildung von H_2O_2 . H_2O_2 ist an der Aktivierung von Immunzellen, der Stimulation von Zellproliferation und –differenzierung, der Apoptose und der Initiation von vaskulären Umbauprozessen beteiligt (Veal 2007). Darüber hinaus ist H_2O_2 ein starkes Oxidationsmittel und führt in hohen Konzentrationen zu oxidativem Stress (Winterbourn 2013). Die Zytotoxizität entsteht dabei durch hochreaktive Hydroxylradikale, die aus H_2O_2 bei der sog. Fenton-Reaktion entstehen (Zitzler 2004). Unter physiologischen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht zwischen dem Auf- und Abbau von H_2O_2 (Veal 2007; Winterbourn 2013). H_2O_2 ist darüber hinaus in der Lage, unter Anwesenheit von Lipopolysacchariden (LPS) die Produktion von NO über die Expression von iNOS in den Mikroglia zu verstärken (Mander 2006; Eguchi 2011). Das von iNOS gebildete NO führt sowohl zu physiologischen, als auch in hohen Konzentrationen zu pathologischen Prozessen (Rosselli 1998).

Oxidativer Stress, ausgelöst durch H_2O_2 in arteriellen pulmonalen glatten Muskelzellen unter Normoxie, führt über den Transkriptionsfaktor NF κ B zur Aktivierung der Promotorregion von HIF-1 α (Bonello 2007; van Uden 2008).

In der hier vorliegenden, mit H_2O_2 behandelten Pilotstudie wurde eine Schweineretina-Organokultur für acht Tage kultiviert. Hierbei sollte der Zeitraum von acht Tagen nicht überschritten werden, da es bei weiterer Kultivierung zu hohen Degenerationseffekten in der Organokultur kommt (Kobuch 2008). Somit ist der limitierende Faktor der Organokultur die begrenzte Kultivierungsdauer. Grund dafür ist u.a. die Abtrennung vom Sehnerven und vom retinalen Pigmentepithel, wodurch die Nährstoffversorgung nicht optimal gesichert werden kann (Bell 2016). Die begrenzte Kultivierungsdauer hat zur Folge, dass eingesetzte Chemikalien, sowie mögliche Therapeutika relativ schnell wirken müssen. Aus einer vorherigen Studie war bekannt, dass eine dreistündige Inkubation mit 300 μ M H_2O_2 ausreicht, um eine Degeneration retinaler Ganglienzellen nach acht Tagen hervorzurufen. Zusätzlich wurde eine deutlich erhöhte Anzahl an Mikroglia sowohl nach drei als auch nach acht Tagen nachgewiesen (Hurst 2017).

Die Pilotstudie dieser Dissertation wurde durchgeführt, um zum einen die bereits durch Hurst et al. (2017) bestehenden Ergebnisse zu verifizieren. Zum anderen musste die Explantation und Kultivierung der Schweineretina zunächst erlernt werden, damit vor allem während der Explantation die mechanische Schädigung der Retina möglichst geringgehalten wurde. Nur so konnte sichergestellt werden, dass die Retinae nicht schon vor der Kultivierung so beschädigt werden, dass sie auch ohne Zugabe von H_2O_2 bereits starke Degenerationen aufwiesen.

Erst nach dem Erlernen der Technik war eine Kultivierung mit möglichen Therapeutika sinnvoll. In der Pilotstudie konnten die Ergebnisse der Studie von Hurst et al. (2017) verifiziert werden. Auch in vorliegender Studie kam es zu einem erwarteten Untergang der retinalen Ganglienzellen nach achttägiger Kultivierung. Grund für diesen Untergang schien der durch H_2O_2 ausgelöste oxidative Stress zu sein. Hohe Konzentrationen von H_2O_2 können nicht mehr durch antioxidative Abwehrkräfte der Zelle kompensiert werden und es folgt ein irreversibler Zell- und Gewebeschaden (Zitzler 2004; Veal 2007).

Auch andere Arbeitsgruppen haben bereits die degenerativen Effekte von H_2O_2 nachgewiesen. So kam es z.B. in einer RGC-5 Zelllinie unter oxidativem Stress durch den Einsatz von H_2O_2 zum Untergang der retinalen Ganglienzellen (Maher 2005).

Des Weiteren wird H_2O_2 in Tiermodellen eingesetzt, wie z.B. im Modell der Nrf2-defizienten Mäuse. Der Transkriptionsfaktor Nrf2 spielt eine wichtige Rolle beim Schutz vor oxidativem Stress. Beweisend dafür war, dass gezeigt werden konnte, dass oxidativer Stress, ausgelöst durch eine Defizienz des Nrf2-Gens, zur Simulation neurodegenerativer Erkrankungen der Retina, mit folgendem Verlust der retinalen Ganglienzellen, führte (Himori 2013). In einer

weiteren Studie mit Ratten konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress, ausgelöst durch Kohlenstoffdisulfid zur Apoptoseinduktion der Neurone des Hippocampus führte. Die betroffenen Ratten zeigten kognitive Dysfunktionen durch Schäden des zentralen Nervensystems (Wang 2017). Anhand der Studien durch Maher et al. (2005), Himori et al. (2013) und Wang et al. (2017) lässt sich erkennen, dass sowohl in der Zellkultur als auch in Tiermodellen oxidativer Stress zur Degeneration verschiedener Neurone führen kann. Die in dieser Dissertation verwendete Organkultur bestätigte ebenfalls diese Ergebnisse, auch hier kam es zu einem Verlust der retinalen Ganglienzellen.

5.2. Kolokalisation von RBPMS und HIF-1 α

Um die retinalen Ganglienzellen darstellen zu können, sind selektive immunhistochemische Marker der retinalen Ganglienzellen nötig.

Um nun eine genaue Aussage zur Wirkweise des iNOS-Inhibitors, und später von Coenzym Q10 auf die retinalen Ganglienzellen treffen zu können, wurde der Antikörper anti-RBPMS etabliert. Im Datenblatt des Herstellers wurde bisher nur von einer Interaktion mit dem Gewebe von Maus, Ratte, Kaninchen, Meerschweinchen und nicht menschlichen Primaten berichtet. Bisher konnte jedoch noch keine Wechselwirkung mit dem Gewebe des Schweines oder dem des Mensch dargestellt werden (Abcam).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Doppelmarkierung von Anti-RBPMS und Anti-HIF-1 α eingeführt. HIF-1 α ist ein Marker für hypoxische Zellen und soll in Zukunft in einer Doppelmarkierung mit RBPMS genutzt werden, um hypoxische retinalen Ganglienzellen darstellen zu können. Diverse Markierungen mit anti- HIF-1 α auf der Retina sind bereits in der Literatur beschrieben worden. So wurden beispielsweise retinale Zellen der Maus durch Caprara et al. mit anti- HIF-1 α dargestellt (Caprara 2011). Im Datenblatt des Herstellers BD Biosciences ist allerdings nur eine Interaktion mit menschlichen Präparaten beschrieben worden (Biosciences). Eine erhöhte Expression von HIF-1 α bei Auslösung einer chemischen Hypoxie durch CoCl₂ auf der Schweineretina wurde bereits durch Kuehn et al. bewiesen (Kuehn 2017). Auch eine Doppelmarkierung von RBPMS und HIF-1 α ist bereits in den Studien von Shen et al. (2018) durchgeführt worden. Hier wurde eine Mäuseretina u.a. zur Charakterisierung der Phenotypen der retinalen Ganglienzellen markiert (Shen 2018).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Doppelmarkierung von anti-RBPMS und anti- HIF-1 α ebenso erfolgreich etabliert werden. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Markierung wurden dazu mit den oben genannten Quellen verglichen.

5.3. Schutz vor oxidativem Stress durch den iNOS-Inhibitor 1400W

Im Rahmen dieser Dissertation wurde u.a. die putativ protektive Wirkung des iNOS-Inhibitors 1400W auf der durch oxidativen Stress geschädigten Schweineretina getestet. Oxidativer

Stress wird chemisch durch H_2O_2 ausgelöst. H_2O_2 führt dabei zu einer Aktivierung von Mikroglia, welche dann iNOS exprimieren und somit NO freisetzen (Haefliger 1999; Hurst 2017).

5.3.1. Schutz der retinalen Ganglienzellen nach vier Tagen durch Inhibierung von iNOS

Zunächst wurden die Effekte des iNOS-Inhibitors in einer Konzentration von 500 μM auf die retinale Schichtung untersucht. Hierzu wurden HE-Übersichtsfärbungen angefertigt. Weder die Zugabe von H_2O_2 noch die Behandlung mit dem iNOS-Inhibitor führten zu Veränderungen der retinalen Schichtung. Daher konnten alle Retinae für weiterführende Analysen verwendet werden.

Wie bereits erwähnt, exprimieren Mikroglia und Makrophagen als Antwort auf einen Entzündungsreiz das Enzym iNOS, welches dann seinerseits NO bildet. NO ist beteiligt an wichtigen physiologischen Funktionen, wie z.B. Vasodilatation, Immunabwehr oder Funktionen als Neurotransmitter (Betteridge 2000). Kommt es allerdings zu einer vermehrten Ausschüttung von Stickstoffmonoxid, kann dieses toxische Effekte haben. Dies zeigt sich auch bei diversen Augenerkrankungen. Kommt es hier zu einer Aktivierung von iNOS, werden über längere Zeit hinweg große Mengen an NO ausgeschüttet, welche zu einer Degeneration des Discus nervi optici und retinaler Degeneration führen können. Folge davon können u.a. ein Glaukom, Alters-abhängige Makuladegeneration, Katarakt oder Uveitis sein (Chiou 2001). Eine Inhibierung von iNOS scheint daher ein interessanter Ansatz zur potentiellen Therapie von Augenerkrankungen zu sein.

Der Schutz der retinalen Ganglienzellen vor oxidativem Stress konnte nach vier Tagen Kultivierung nachgewiesen werden. Auch in anderen Studien konnte die Relevanz von iNOS bei der Pathogenese von Augenerkrankungen bestätigt werden. So konnte beispielsweise in einer Studie mit Patienten, die an einem primären Offenwinkelglaukom litten, nachgewiesen werden, dass bei diesen in Regionen des neuronalen Schadens reaktive Astrozyten iNOS exprimieren. Es konnte also die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Astrozyten im N. opticus eine lokale Neurotoxizität auf die Axone der retinalen Ganglienzellen durch Expressierung von iNOS ausüben (Liu 2000). Liu et al. (2000) konnten also zeigen, dass eine Inhibierung der iNOS möglicherweise zu einem Schutz der Neurone führen könnte. Aktivierte Mikroglia exprimieren vermehrt iNOS, welche dann große Mengen an neurotoxischem NO ausschütten. Die direkte Toxizität von NO auf die betreffenden Zellen hängt dabei von der Menge des ausgeschütteten NO ab. Wird iNOS nun durch einen selektiven Hemmer, wie 1400W gehemmt, kommt es zum Schutz der Neurone (Golde 2002).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Ergebnisse.

Die retinalen Ganglienzellen gingen durch die Behandlung mit H_2O_2 deutlich unter. Demnach scheint H_2O_2 toxisch auf die retinalen Ganglienzellen gewirkt zu haben. Denkbar könnte auch eine Aktivierung der Mikroglia durch H_2O_2 sein, welche dann über die Aktivierung von iNOS zum Untergang der retinalen Ganglienzellen geführt haben könnten. Dies wurde jedoch in dieser Arbeit nicht weiter erforscht. Die Aktivierung der Mikroglia konnte dennoch zuvor durch Hurst et al. (2017) bestätigt werden. Aufgrund der Ergebnisse von Hurst et al. (2017) kann die Hypothese gestellt werden, dass die Hemmung der iNOS und die damit verbundene Hemmung der Ausschüttung von toxischem NO zum Schutz der retinalen Ganglienzellen führte.

Auch in einem Tiermodell der Ratte konnte iNOS bei chronisch erhöhtem IOP nachgewiesen werden. In diesem Modell der Ratte wurde untersucht, ob iNOS oder andere Formen der NO-Synthasen bei erhöhtem Augeninnendruck über drei Monate im Discus nervi optici vorkommen und dort neurotoxisch wirken. Es zeigte sich eine exzessive Produktion von NO, ausgelöst durch iNOS. Shareef et al. (1999) konnten andere Isoformen der NO-Synthasen im erkrankten Auge nicht nachweisen, wodurch sie davon ausgingen, dass das toxische NO durch iNOS generiert wurde (Shareef 1999). Diese Studie scheint ebenso zu beweisen, dass die großen Mengen an NO durch iNOS eine Neurotoxizität hervorrufen. Andere Arbeitsgruppen kamen zu ähnlichen Ergebnissen. So kam es z.B. in einem Modell der Ratte bei 6-monatiger Erhöhung intraokulären Drucks mit gleichzeitiger Behandlung mit einem iNOS-Inhibitor zu nur 10% Verlust der retinalen Ganglienzellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe mit 36% Verlust. Die Erhöhung des intraokulären Drucks wurde unilateral moderat durch Kauterisieren der episkleralen Venen chronisch erhöht. Das zweite Auge diente als Kontrollauge (Neufeld 1999). Die retinalen Ganglienzellen scheinen also auch hier, wie in der vorliegenden Arbeit durch die Auswirkungen der iNOS unterzugehen und durch deren Inhibierung geschützt zu werden. In einem weiteren Modell konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von iNOS in Pankreaszellen der Maus und Ratte u.a. die toxischen Effekte von H_2O_2 herabsetzen konnte (Michalska 2010). Diese Studie zeigt zum einen, dass iNOS nicht nur in neuronalem Gewebe eine toxische Wirkung über NO ausübt. Zum anderen beweist sie die Aktivierung von iNOS durch den Einsatz von H_2O_2 , wie es auch in der vorliegenden Arbeit der Fall ist.

Andere Arbeitsgruppen in der Glaukomforschung kamen zu negativen Ergebnissen hinsichtlich des Einsatzes eines iNOS-Inhibitors. Hier wurde in einem Modell der Ratte durch Injektion von hypertoner Salzlösung der IOP erhöht und die Retina, als auch der Discus nervi optici anschließend sowohl immunhistologisch, als auch via PCR auf NO-Synthasen untersucht. Des Weiteren wurden die Ratten in einem zweiten Versuch durch Zugabe eines iNOS-Inhibitors ins Trinkwasser behandelt. Es zeigte sich weder eine Erhöhung von iNOS in der Retina, noch im Sehnervenkopf oder in der Ganglienzellschicht der Retina. Auch zeigte

sich kein Effekt der Inhibierung von iNOS (Pang 2005). Bei dieser Studie wurde der Inhibitor oral über das Trinkwasser verabreicht, wodurch der Inhibitor möglicherweise aufgrund von zu geringer Konzentration oder Unvermögen des Inhibitor-Moleküls die Barrieren des Körpers bis zum Auge zu überwinden keinerlei Wirkung zeigte. Des Weiteren scheint in dieser Studie iNOS nicht einmal exprimiert worden zu sein, wodurch die Inhibierung hinfällig war. Warum iNOS hier, trotz der Erhöhung des IOP durch hypertone Kochsalzlösung, nicht exprimiert wurde, bleibt ungeklärt, zumal andere, bereits zuvor genannte Studien durch Erhöhung des IOP eine signifikante Erhöhung von iNOS nachweisen konnten.

Insgesamt scheint der iNOS-Inhibitor 1400W jedoch ein vielversprechender Ansatz zur möglichen Therapie von durch oxidativen Stress ausgelösten Erkrankungen des Auges zu sein.

5.4. Schutz vor Hypoxie durch den iNOS-Inhibitor 1400W

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde des weiteren die potentiell protektive Wirkung des iNOS-Inhibitors 1400W auf der durch chemische Hypoxie geschädigten Schweineretina getestet. Eine chemische Hypoxie wurde durch CoCl_2 ausgelöst. Der folgende Untergang der retinalen Ganglienzellen sollte nun durch die Inhibierung der iNOS minimiert werden. Eine vorherige Studie führte mit geringeren Konzentrationen des iNOS-Inhibitors 1400W im Hypoxiemodell nicht zu dem gewünschten Effekt (Maliha 2017). Erhöhte Konzentration des Inhibitors auf 500 μM in vorliegender Arbeit führten zu vielversprechenden Ergebnissen.

5.4.1. Schutz der retinalen Ganglienzellen nach vier und acht Tagen durch Inhibierung von iNOS

Auch in diesen Studien wurden zunächst HE-Übersichtsfärbungen der kultivierten Retinae angefertigt und mikroskopisch beurteilt. Die retinale Schichtung war sowohl in der Degenerationsgruppe als auch in der Kontroll- und Inhibitorgruppe erhalten. Somit konnten die Retinae für weiterführende Untersuchungen verwendet werden.

Eine chemische Hypoxie führt u.a. über den HIF-1 α -Weg zu einer verstärkten Synthese des Enzyms iNOS und einer damit verbundenen erhöhten Ausschüttung von NO (Rosselli 1998; LaManna 2004). Wie zuvor durch Kuehn et al. (2017), konnte auch durch Reiß (2018) in der Pilotstudie der vorliegenden Arbeit ein Verlust der retinalen Ganglienzellen durch den Einsatz von CoCl_2 dargestellt werden (Kuehn 2017; Reiß 2018). Kuehn et al. konnten des Weiteren eine Erhöhung der Expressierung von HIF-1 α zeigen (Kuehn 2017). Aufgrund dessen und der durch die Erhöhung von HIF-1 α zu erwartenden vermehrten Expressierung von iNOS wurde von Maliha (2017) eine erste Studie mit dem iNOS-Inhibitor 1400W angeschlossen. Hier kam es trotz Einsatz des Inhibitors zu einem signifikanten Untergang

der retinalen Ganglienzellen (Maliha 2017). Daraufhin wurde in dieser Dissertation zunächst die iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses durchgeführt. Aufgrund der positiven Ergebnisse, wurde die vorliegende Studie angeschlossen. Desweiteren kam die Vermutung auf, dass die Konzentration des Inhibitors zuvor zu niedrig gewählt wurde, um auf alle Schichten der Retina wirken zu können (Maliha 2017).

Diese Vermutung scheint zuzutreffen, da in den Ergebnissen dieser Dissertation zu erkennen ist, dass die retinalen Ganglienzellen sowohl nach vier, als auch nach acht Tagen Kultivierung signifikant vor den Auswirkungen der chemischen Hypoxie geschützt werden könnten. Die toxischen Effekte der iNOS, ausgelöst über den HIF-1 α -Weg scheinen u.a. für den Untergang der retinalen Ganglienzellen verantwortlich zu sein, da die Inhibierung mit dem iNOS-Inhibitor zu dem gewünschten, protektiven Effekt führte. Die Inhibierung von iNOS ist darüber hinaus nur langsam reversibel und hochselektiv (Garvey 1997).

Es sollte bedacht werden, dass sowohl zu viel als auch zu wenig NO zu Erkrankungen des Auges führen können. Ist zu wenig NO vorhanden, werden in der Ophthalmologie beispielsweise NO-Donatoren eingesetzt, welche dann z.B. zu einer Vasodilatation im Auge, einem verminderten IOP und einer Relaxation des Ziliarmuskels führen. Für die Produktion von NO im physiologischen Bereich sind die eNOS und nNOS verantwortlich. Kommt es allerdings zu pathologischen Zuständen, wird die iNOS aktiviert. Diese wiederum produziert dann über einen langen Zeitraum hinweg große Mengen an NO, welches über die Entstehung von NO₂, Nitrit, Peroxynitrit und freien Radikalen toxisch wirkt und u.a. zum Glaukom führen kann (Chiou 2001). Dementsprechend scheint die Inhibierung von iNOS ein sinnvoller Therapieansatz zu sein, da hier nur die NO-Produktion im Übermaß inhibiert wird. Auch Shi et al. (2017) kamen zu ähnlich positiven Ergebnissen bezüglich des Einsatzes des iNOS-Inhibitors 1400W. So kam es in einem Hypoxiemodell der Ratte mit anschließender Reoxygenierung zu einer Beeinträchtigung des räumlichen Denkens der Ratten. Nachgewiesen werden konnten eine Aktivierung der Mikroglia, eine Erhöhung von iNOS und NO, sowie eine gesteigerte Apoptoserate im cerebralen Cortex einen Tag nach Reoxygenierung. Im gleichen Modell wurde der iNOS-Inhibitor 1400W eingesetzt. Es zeigte sich keine Beeinträchtigung der eNOS oder nNOS, sowie eine verminderte Apoptoserate und verminderte NO-Produktion. Dementsprechend wurde das räumliche Denken der Ratten nach Hypoxieeinwirkung und Einsatz des iNOS-Inhibitors 1400W verbessert (Shi 2017). In der Studie durch Shi et al. (2017) konnte also, wie auch in vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass die Inhibierung von iNOS durch 1400W eine neuroprotektive Wirkung zeigt.

Neufeld et al. (2002) konnten nach sieben monatigem chronisch moderat erhöhten IOP bei der Ratte bei der Behandlung mit einer inaktiven Vorstufe eines selektiven iNOS-Inhibitors einen Schutz der retinalen Ganglienzellen herbeiführen (Neufeld 2002). Hier konnte nun gezeigt werden, dass auch eine längere Behandlung mit einem iNOS-Inhibitor zu protektiven

Effekten führen kann. Da zwar eine längere Kultivierung der Schweineretinaorgankultur aufgrund des vermehrten Zellunterganges nicht möglich ist, sollte dennoch in Betracht gezogen werden, dass es sich bei dem iNOS-Inhibitor 1400W um ein künftiges Langzeittherapeutikum handeln könnte.

Rus et al. (2010) bewiesen die positive Wirkung von 1400W in einem Hypoxie/Reoxygenierungs-Modell der Rattenlunge. Hierbei wurden die Ratten für 30 Minuten einer Hypoxie ausgesetzt, mit und ohne Behandlung mit 1400W. Direkt nach der Behandlung, nach 48 Stunden und fünf Tagen wurde das Apoptoselevel, der NO-Gehalt, die Lipidperoxidation und die Proteinnitration gemessen. Das Resultat war, dass die Inhibition von iNOS zu verminderten Schäden in der Lunge führte (Rus 2010). Auch hier wurde der iNOS-Inhibitor 1400W mit Erfolg eingesetzt, wodurch davon auszugehen ist, dass das Enzym nicht nur neuronale Schäden, sondern auch Schäden anderer Gewebe hervorzurufen scheint.

Ein weiteres Modell bewies das therapeutische Potential von 1400W. László et al. testeten die Wirkung von Isoform-selektiven und nicht-selektiven NO-Synthase-Inhibitoren bei Endotoxin-bedingten vaskulären Schäden des Colons der Ratte. Bei allen Inhibitoren kam es zu einem verminderten Schaden im Colon der Ratte, wobei die Wirksamkeit von 1400W am längsten war (Laszlo 1997).

Beim Vergleich der Studie von Laszlo et al. (1997) mit der vorliegenden, ist zum einen zu erkennen dass die iNOS wiederum nicht nur zu Schäden der retinalen Ganglienzellen führen, sondern auch in anderen Geweben einen deutlichen Schaden hervorrufen kann. Zum anderen scheint die Auswahl eines selektiven Inhibitors von Vorteil zu sein, da nur so sichergestellt werden kann, dass nur das Schaden auslösende Enzym iNOS selektiv gehemmt wird.

Der in vorliegender Arbeit verwendete Inhibitor scheint demnach eine gute Langzeitwirkung (Neufeld 2002) sowie eine sehr gute Selektivität zu besitzen (Garvey 1997). Das therapeutische Potential des iNOS-Inhibitors 1400W bei verschiedenen Erkrankungen des Auges scheint dementsprechend groß zu sein.

5.5. Kein Schutz vor oxidativem Stress durch Coenzym Q10 nach vier Tagen

Im Körper existiert CoQ10 in unterschiedlichen Formen, oxidiert als Ubiquinon, teilweise reduziert als Semiquinon-Radikal oder reduziert als Ubiquinol, abhängig von dem Metabolismus der Zelle (Lenaz 2009). In den meisten Studien, wie auch in dieser Dissertation, wird das oxidierte CoQ10, also Ubiquinon eingesetzt, da lange Zeit keine stabile Verbindung der eigentlich therapeutisch sinnvolleren reduzierten Form erhältlich war. Bei der reduzierten Form handelt es sich um ein Molekül, das nicht zunächst vom Körper von

der oxidierten in die reduzierte Form umgewandelt werden muss und somit schneller als Antioxidans verfügbar wäre (Zhang 2017).

5.5.1. Kein Schutz der retinalen Ganglienzellen durch 100 und 300 μM Coenzym Q10

Da bereits der Einsatz von 100 μM CoQ10 nicht zu den gewünschten Ergebnissen führte, wurde für diese Dissertation noch eine zweite CoQ10-Studie unter Einsatz von 300 μM CoQ10 durchgeführt. Auch diese Studie führte nicht zu dem gewünschten Schutz der retinalen Ganglienzellen. Die retinalen Ganglienzellen der Degenerationsgruppe gingen unter Einsatz von H_2O_2 nicht signifikant unter. Dies scheint ein Hinweis darauf zu sein, dass entweder das verwendete H_2O_2 nicht oder nur abgeschwächt gewirkt hat, oder während der gesamten Kultivierungsdauer ein Fehler unterlaufen ist, da die Degeneration mit H_2O_2 in den Studien zuvor immer zu einem signifikanten Untergang der retinalen Ganglienzellen führte.

In der Literatur wurden bisher mehrere positive Effekte von CoQ10 beschrieben. So hat der Einsatz von nur 1 μM oder 10 μM CoQ10 einen starken antioxidativen Effekt auf die zuvor mit H_2O_2 geschädigte Organkultur gesunder humaner nasaler Mukosa. Hierbei führte CoQ10 zu einem deutlich geringeren DNA-Schaden verglichen mit der H_2O_2 -Gruppe. Jedoch wurden die Organkulturen bei dieser Studie zunächst mit CoQ10 behandelt und anschließend mit H_2O_2 geschädigt (Reiter 2009). Da durch Reiter et al. (2009) deutlich geringere Konzentrationen von CoQ10 in einer Organkultur eingesetzt wurden, scheint ein Fehler hinsichtlich zu geringer Konzentration von CoQ10 in der vorliegenden Arbeit eher unwahrscheinlich. Dennoch sollte beachtet werden, dass hier, anders als in der vorliegenden Dissertation, Coenzym Q10 vor der eigentlichen Schädigung verwendet wurde. Demnach war das Gewebe möglicherweise schon mit CoQ10 angereichert und der oxidative Stress, ausgelöst durch H_2O_2 , konnte direkt minimiert werden.

In diversen Studien des Auges wird ein positiver Effekt durch CoQ10 beschrieben. So kam es bei *in vivo* und *in vitro* Versuchen durch Nakajima et al. durch CoQ10 zu einer Protektion der retinalen Ganglienzellen. Hierbei wurde die RGZ-5-Linie der Ratte mit H_2O_2 geschädigt und mit CoQ10 und einem Vitamin E-Analog behandelt. Es konnte ein reduzierter Zellschaden, sowie eine reduzierte Apoptoserate durch Inhibierung des oxidativen Stresses nachgewiesen werden. Nach einer Schädigung des Mäuseauges durch N-Methyl-D-Aspartat und anschließender oraler Behandlung mit CoQ10 und alpha-Tocopherol für 14 d wurde ein reduzierter Schaden in der retinalen Ganglienzell-Schicht beobachtet (Nakajima 2008). Anhand dieser Studie zeigte sich, dass der Einsatz von CoQ10 nach der Schädigung auch zur Protektion der Zellen führen kann. Demnach hätte die zeitgleiche Behandlung von CoQ10 und H_2O_2 in den Studien dieser Dissertation auch zum Schutz der retinalen Ganglienzellen führen müssen.

Auch als Augentropfen scheint CoQ10 wirksam zu sein. Hierbei wurde eine Toxizität durch Kainat in der Retina der Maus ausgelöst und die Mäuse anschließend mit 10 µM CoQ10-Augentropfen behandelt. Der CoQ10-Gehalt der Retina wurde gemessen und es zeigte sich, dass dieser deutlich anstieg. So konnten Lulli et al. (2012) beweisen, dass CoQ10 in der Lage ist, die Retina durch die Kornea hinweg zu erreichen. Zudem kam es zu einer nachweislichen Protektion der retinalen Schichten vor apoptotischen Prozessen. Daher gingen sie davon aus, dass CoQ10 zwar freie Radikale direkt abfängt, jedoch auch die Apoptose über Hemmung der Depolarisation der Mitochondrien verhindert (Lulli 2012). Auch Lulli et al. (2012) setzten deutlich geringere Konzentrationen des CoQ10 ein, als in vorliegender Arbeit verwendet wurden. Zudem wurden im Vergleich zur vorliegenden Studie CoQ10-Augentropfen eingesetzt, welches eine Behandlungsmethode ist, bei der die Retina deutlich schwieriger zu erreichen ist, als durch direkte Applikation auf die Retina, wie bei der Organkultur. Da sogar dies zu einer Protektion der retinalen Ganglienzellen führen konnte, scheint ein Fehler bei der Kultivierung oder Auswertung der vorliegenden Studien immer wahrscheinlicher. Da die Kultivierung der CoQ10-Studien unter gleichen Bedingungen wie die der iNOS-Inhibitorstudie durchgeführt wurde, scheint der Fehler eher in folgenden Schritten zu liegen. Es wäre beispielsweise denkbar, dass der Prozess der Fixierung der Retina auf dem Objektträger für weitere Untersuchungen zu möglichen Schäden an den Retinae geführt haben könnte und somit die Ergebnisse verfälscht haben könnte.

Eine weitere Studie mit der reduzierten Form des CoQ10 konnte einen Schutz der retinalen Ganglienzellen nachweisen. Diese Arbeitsgruppe setzte ein Ischämie/Reperusionsmodell zur akuten Erhöhung des IOP bei der Maus ein. Anschließend wurde den Mäusen oral CoQ10 verabreicht. Nach zwei Wochen konnte eine signifikante Verminderung der Aktivität der Mikro- und Astroglia, sowie eine verminderte Apoptoserate der retinalen Ganglienzellen nachgewiesen werden (Ju 2018). Auch diese Studie von Ju et al. (2018) ist ein weiterer Hinweis darauf, dass bei den CoQ10-Studien der vorliegenden Dissertation ein Fehler unterlaufen sein muss. Anhand der Studien von Nakajima et al. (2008), Lulli et al. (2012) und Ju et al. (2018) scheint CoQ10 über mehrere Wege den Zelltod zu verhindern. Demnach scheint CoQ10 insgesamt ein vielversprechendes Therapeutikum für u.a. retinale Erkrankungen zu sein. Die Ergebnisse dieser Dissertation scheinen demnach eher eine Ausnahme darzustellen.

Da bereits viele Arbeitsgruppen mit der oxidierten Form des CoQ10 gearbeitet haben und positive Ergebnisse erhielten, scheint auch der Einsatz der oxidierten Form nicht der Grund für die Wirkungslosigkeit in diesen Studien zu sein. Eine Konzentrations-abhängige Unwirksamkeit ist nicht auszuschließen, obwohl verschiedenste Arbeitsgruppen, beispielsweise Lulli et al. (2012), mit deutlich geringeren Konzentrationen eine Protektion der Zellen vor oxidativem Stress hervorrufen konnten (Lulli 2012).

Des Weiteren wären speziesspezifische Unterschiede denkbar. Die hier diskutierten Studien arbeiteten größtenteils mit Geweben von Nagern. Möglicherweise ist das verwendete CoQ10 nicht in der Lage die gewünschte Protektion an einer porcinen Retina herbeizuführen. Nageraugen sind deutlich kleiner als das Schweineauge, die Schichten, die das CoQ10 Molekül überwinden muss sind demnach dünner. Somit wäre es denkbar, dass eine wirksame Konzentration des Moleküls in der retinalen Ganglienzell-Schicht nach vier Tagen Kultivierung nicht erreicht werden konnte. Da jedoch Lulli et al. (2012) sogar eine Protektion der Retina durch CoQ10-haltige Augentropfen hervorrufen konnten, scheint diese Hypothese eher unwahrscheinlich zu sein.

Eine weitere Fehlerquelle könnte der Emulgator Lutrol sein. Trotz Einsetzen des Emulgators gestaltete sich die Mischbarkeit mit CoQ10 schwierig. Auch nach gutem Durchmischen zeigte sich keine komplett homogen gemischte Flüssigkeit. Dementsprechend ist es möglich, dass nach Mischen mit dem Medium CoQ10 immer noch nicht optimal gelöst war und somit auch nicht wie gewünscht wirken konnte.

Im weiteren Verlauf sollte die CoQ10-Studie im Hinblick auf diese möglichen Fehlerquellen wiederholt werden. Denkbar wäre zunächst eine Studie mit anderen Konzentrationen von CoQ10. Des Weiteren sollte die Durchmischung von Emulgator und CoQ10 optimiert werden. Laut Literatur scheint CoQ10 aber alles in allem ein vielversprechendes potentielles Therapeutikum retinaler Erkrankungen sein und sollte auch auf der Schweineretinaorgankultur weiter erforscht werden (Nakajima 2008; Lulli 2012; Ju 2018).

5.6. Vergleich der untersuchten Therapeutika

Sowohl der iNOS-Inhibitor 1400W, als auch CoQ10 scheinen ein hohes Potential zu haben, als mögliche Therapeutika in der Augenheilkunde eingesetzt zu werden.

Bei einem Vergleich der beiden Therapeutika fallen mehrere Unterschiede auf. Den ersten Unterschied stellt die Molekülgröße dar. Der iNOS- Inhibitor weist ein Molekulargewicht von 250,17 Da auf, die Strukturformel hierzu lautet $C_{10}H_{15}N_3 \times 2 HCl$ (Merck). Im Vergleich hierzu ist das Molekulargewicht von CoQ10 mit 863,34 Da deutlich größer. $C_{59}H_{90}O_4$ ist die zugehörige Strukturformel von CoQ10 (Aldrich). Der Unterschied dieser beiden Molekülgrößen konnte eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse der CoQ10-Studien sein. Kleinere Moleküle können einfacher in die Zellen gelangen als größere. So nimmt die Permeabilität der Moleküle mit zunehmender Größe ab. Dieses konnte durch Ambati et al. (2000) in einer Studie der skleralen Diffusion gezeigt werden. Diese fanden heraus, dass große Moleküle schlechter in der Lage waren die Sklera zu passieren, als weniger große Moleküle. Auch fanden sie heraus, dass der strukturelle Aufbau der Moleküle bedeutsam zu sein scheint (Ambati 2000). Somit wäre denkbar, dass CoQ10 aufgrund der Molekülgröße

und Molekülbeschaffenheit nicht bzw. nur begrenzt in der Lage war, die Zellen der Retina vor oxidativem Stress zu schützen.

Auch die Wirkungsweisen der beiden potentiellen Therapeutika unterscheiden sich. Der iNOS-Inhibitor stellt wie zuvor erwähnt einen irreversiblen, bzw. langsam reversiblen Inhibitor der iNOS dar. Durch diesen wird die durch iNOS katalysierte Reaktion von L-Arginin zu L-Citrullin und NO gehemmt (Garvey 1997). Diese Hemmung bewirkt, dass die iNOS als Reaktion auf Hypoxie oder oxidativen Stress keine große Menge an zytotoxischem NO freisetzen kann (Betteridge 2000). Der hiermit verbundene Zelluntergang soll durch den Inhibitor gehemmt werden.

Der Ansatz eine durch oxidativen Stress geschädigte Retina mit CoQ10 zu behandeln, unterscheidet sich hiervon. CoQ10 stellt einen essentiellen Cofaktor im Elektronentransport der Atmungskette in den Mitochondrien dar. Darüber hinaus schützt CoQ10 als Antioxidans in den Mitochondrien und Zellmembranen vor freien Radikalen (Yang 2016). Daraus ergibt sich ein essentieller Unterschied zwischen den beiden Substanzen. CoQ10 eliminiert als Antioxidans die durch den oxidativen Stress entstehenden ROS und schützt somit die Zellen vor oxidativen Schäden, während der iNOS-Inhibitor schon alleine die Entstehung von toxischem NO verhindert. Der Inhibitor hemmt also schon die Entstehung toxischer Stoffe, wobei CoQ10 schädigende Moleküle unschädlich machen soll.

Schlussfolgernd stellen beide Therapeutika interessante Ansätze für die Neuroprotektion der Retina dar. Die positiven Ergebnisse des iNOS-Inhibitors in dieser Arbeit zeigen das hohe therapeutische Potential des Inhibitors. Die Ergebnisse der CoQ10-Studie konnten allerdings nicht den gewünschten Effekt zeigen. Hier bedarf es noch weiterer Studien, um neue Ansätze für den Einsatz des Therapeutikums zu finden.

6. Zusammenfassung

Wirkung verschiedener Therapeutika in einer durch Hypoxie oder oxidativen Stress geschädigten Organkultur der Schweineretina

Hypoxie und oxidativer Stress sind wichtige Pathomechanismen verschiedener retinaler Erkrankungen, wie z.B. dem Glaukom. Eine Hypoxie kann durch Kobaltchlorid (CoCl_2) chemisch induziert werden, wohingegen Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oxidativen Stress auslösen kann.

Basierend auf zwei etablierten Modellen kultivierter Schweineretinae (Hurst 2017; Kuehn 2017), wurde in dieser Dissertation die potentiell neuroprotektive Wirkung des iNOS-Inhibitors 1400W getestet. In einer weiteren Studie wurde die Neuroprotektion durch das Antioxidans Coenzym Q10 (CoQ10) untersucht.

Die Wirkung des iNOS-Inhibitors wurde in beiden Modellen untersucht, bei denen entweder durch CoCl_2 (300 μM) hypoxische Prozesse nachgeahmt wurden, oder durch 300 μM H_2O_2 oxidativer Stress ausgelöst wurde. Die Wirkung von CoQ10 wurde nur im Modell des oxidativen Stresses untersucht. Die Behandlung mit dem iNOS-Inhibitor dauerte insgesamt 72 h, die mit CoQ10 48 h.

Die retinalen Ganglienzellen wurden mittels anti-RBPMS Antikörper immunhistochemisch markiert, anschließend via ImageJ ausgezählt und schließlich mittels einer einfaktoriellen ANOVA mit anschließendem Tukey Test post hoc analysiert.

Der Einsatz des iNOS-Inhibitors im Hypoxiemodell konnte sowohl nach vier als auch nach acht Tagen eine signifikante Protektion der retinalen Ganglienzellen hervorrufen. CoCl_2 hingegen führte zu einem signifikanten Verlust der retinalen Ganglienzellen, sowohl nach vier als auch nach acht Tagen im Vergleich zu den Kontroll-Retinae.

Im zweiten Projekt kam es zu einer signifikanten Protektion der retinalen Ganglienzellen vor oxidativem Stress durch den iNOS-Inhibitor. H_2O_2 führte zu einem signifikanten Verlust der retinalen Ganglienzellen nach vier und acht Tagen Kultivierung, wohingegen der iNOS-Inhibitor nach vier und acht Tagen die retinalen Ganglienzellen vor oxidativem Stress schützte.

Im Vergleich dazu führte der Einsatz von 100, als auch von 300 μM CoQ10 zu keinem signifikanten Schutz der retinalen Ganglienzellen.

Hypoxie und oxidativer Stress, induziert durch CoCl_2 und H_2O_2 , führen zu einem signifikanten Verlust der retinalen Ganglienzellen. Beide Degenerationsmodelle scheinen geeignet zu sein, um potentielle Neuroprotektiva zu testen. Wie in den iNOS-Inhibitor-Studien gezeigt werden konnte, schützte der iNOS-Inhibitor 1400W die retinalen Ganglienzellen vor Hypoxie und oxidativem Stress.

In weiteren Studien sollten daher die Effekte des iNOS-Inhibitors auf andere retinale Zellen untersucht werden, um den exakten Wirkungsmechanismus besser verstehen zu können. Auch CoQ10 als mögliches Neuroprotektivum sollte weitergehend erforscht werden.

7. Summary

Effect of different therapeutics in an organ culture of porcine retina damaged by hypoxia or oxidative stress

Hypoxia and oxidative stress are pathomechanisms that are involved in several retinal diseases, such as glaucoma. Hypoxia can be chemically induced by cobalt chloride (CoCl_2), whereas hydrogen peroxide (H_2O_2) can cause oxidative stress.

Based on two established models of cultured porcine retinae (Hurst 2017; Kuehn 2017), the potential neuroprotective effect of the iNOS-inhibitor was tested in this dissertation.

In another study the neuroprotection by the antioxidant coenzyme q10 (CoQ10) was examined.

The effect of the iNOS-inhibitor was investigated using both models, in which either hypoxic processes were mimicked by CoCl_2 (300 μM), or triggered by oxidative stress induced by 300 μM H_2O_2 . The effect of CoQ10 was only examined in the model of oxidative stress. The treatment with 500 μM of the iNOS-inhibitor 1400W lasted 72 h, that with CoQ10 48 h.

Retinal ganglion cells were immunohistochemically labeled with anti-RBPMS antibody, then counted using ImageJ and finally analyzed post hoc using a one-factorial ANOVA followed by a Tuckey test.

The use of the iNOS inhibitor in the hypoxia model was able to produce a significant protection of the retinal ganglion cells after four and eight days. CoCl_2 resulted in a significant loss of retinal ganglion cells at four and eight days in comparison to the control retinas.

In a second project, the retinal ganglion cells were significantly protected from oxidative stress by the iNOS inhibitor. H_2O_2 resulted in a significant loss of retinal ganglion cells after four and eight days of cultivation, whereas the iNOS inhibitor protected the retinal ganglion cells from oxidative stress after four and eight days.

In comparison, the use of 100 and 300 μM CoQ10 did not lead to any significant protection of the retinal ganglion cells.

Hypoxia and oxidative stress induced by CoCl_2 and H_2O_2 result in a significant loss of retinal ganglion cells. Both degeneration models serve as suitable models to investigate potential neuroprotective agents. As shown in the iNOS inhibitor studies, the iNOS inhibitor 1400W protects the retinal ganglion cells against both pathomechanisms.

For further studies, more retinal cells should be investigated to get a better understanding of the exact mechanism of the iNOS inhibitor.

CoQ10 as a possible neuroprotectant should also be further explored.

8. Literaturverzeichnis

- Abcam. "Anti-RBPMS antibody (ab194213).", abgerufen am 14.03.2019 um 10:14 unter <https://www.abcam.com/rbpms-antibody-ab194213.html>.
- Agarwal, R., S. K. Gupta, P. Agarwal, R. Saxena und S. S. Agrawal (2009). "Current concepts in the pathophysiology of glaucoma." *Indian Journal of Ophthalmology* 57(4): 257-266.
- Ahram, D. F., A. C. Cook, H. Kecova, S. D. Grozdanic und M. H. Kuehn (2014). "Identification of genetic loci associated with primary angle-closure glaucoma in the basset hound." *Molecular Vision* 20: 497-510.
- Aldrich, S. "Coenzyme Q10.", abgerufen am 07.07.2019 um 15:36 Uhr unter <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c9538?lang=de®ion=DE>.
- Ambati, J., C. S. Canakis, J. W. Miller, E. S. Gragoudas, A. Edwards, D. J. Weissgold, I. Kim, F. C. Delori und A. P. Adamis (2000). "Diffusion of high molecular weight compounds through sclera." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 41(5): 1181-1185.
- Bell, K., C. Wilding, S. Funke, N. Perumal, S. Beck, D. Wolters, J. Holz-Muller, N. Pfeiffer und F. H. Grus (2016). "Neuroprotective effects of antibodies on retinal ganglion cells in an adolescent retina organ culture." *Journal of Neurochemistry* 139(2): 256-269.
- Beltran, E., Matiasek, K., Hartley, C. (2017). *Equine neuro-ophthalmology*. 568. In: Gilger, B. C. 3. Aufl., "Equine Ophthalmology." Wiley Blackwell Verlag.
- Betteridge, D. J. (2000). "What is oxidative stress?" *Metabolism* 49(2 Suppl 1): 3-8.
- Biosciences, B. "Purified Mouse Anti-Human HIF-1 α Clone 54/HIF-1 α .", abgerufen am 14.03.2019 um 10:31 unter <http://www.bdbiosciences.com/eu/applications/research/stem-cell-research/mesoderm-markers/human/purified-mouse-anti-human-hif-1-54hif-1/p/610958>.
- Bonello, S., C. Zahringer, R. S. BelAiba, T. Djordjevic, J. Hess, C. Michiels, T. Kietzmann und A. Gorlach (2007). "Reactive oxygen species activate the HIF-1 α promoter via a functional NF κ B site." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27(4): 755-761.
- Brooks, D. E., A. M. Komaromy und M. E. Kallberg (1999). "Comparative optic nerve physiology: implications for glaucoma, neuroprotection, and neuroregeneration." *Veterinary Ophthalmology* 2(1): 13-25.
- Caltana, L., A. Merelli, A. Lazarowski und A. Brusco (2009). "Neuronal and glial alterations due to focal cortical hypoxia induced by direct cobalt chloride (CoCl₂) brain injection." *Neurotoxicity Research* 15(4): 348-358.
- Caprara, C., M. Thiersch, C. Lange, S. Joly, M. Samardzija und C. Grimm (2011). "HIF1A is essential for the development of the intermediate plexus of the retinal vasculature." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 52(5): 2109-2117.
- Chandler, M. J., P. J. Smith, D. A. Samuelson und E. O. MacKay (1999). "Photoreceptor density of the domestic pig retina." *Veterinary Ophthalmology* 2(3): 179-184.
- Chiou, G. C. (2001). "Review: effects of nitric oxide on eye diseases and their treatment." *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 17(2): 189-198.
- Cui, H., Y. Kong und H. Zhang (2012). "Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging." *Journal of Signal Transduction* 2012: 646354.
- Deeg, C. A., Ed. (2010). Sehen. Kapitel 5.4. 87-97. In: von Engelhardt, W., 3. Aufl., *Physiologie der Haustiere*. Stuttgart, Enke Verlag.

- Eguchi, H., N. Fujiwara, H. Sakiyama, D. Yoshihara und K. Suzuki (2011). "Hydrogen peroxide enhances LPS-induced nitric oxide production via the expression of interferon beta in BV-2 microglial cells." *Neuroscience Letters* 494(1): 29-33.
- Esson, D. W., Ed. (2015). *Feline Aqueous Humor Misdirection Syndrome (AHMS)*, Kapitel 140. In: *Clinical Atlas of Canine and Feline Ophthalmic Disease*. John Wiley & Sons Verlag
- Fedtsova, N. G. und E. E. Turner (1995). "Brn-3.0 expression identifies early post-mitotic CNS neurons and sensory neural precursors." *Mechanisms of Development* 53(3): 291-304.
- Flammer, J., S. Orgul, V. P. Costa, N. Orzalesi, G. K. Kriegelstein, L. M. Serra, J. P. Renard und E. Stefansson (2002). "The impact of ocular blood flow in glaucoma." *Progress in Retinal Eye Research* 21(4): 359-393.
- Flanagan, J. G. (1998). "Glaucoma update: epidemiology and new approaches to medical management." *Ophthalmic and Physiological Optics* 18(2): 126-132.
- Garvey, E. P., J. A. Oplinger, E. S. Furfine, R. J. Kiff, F. Laszlo, B. J. Whittle und R. G. Knowles (1997). "1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo." *Journal of Biological Chemistry* 272(8): 4959-4963.
- Gelatt, K. N. und E. O. MacKay (2004). "Prevalence of the breed-related glaucomas in pure-bred dogs in North America." *Veterinarian Ophthalmology* 7(2): 97-111.
- Golde, S., S. Chandran, G. C. Brown und A. Compston (2002). "Different pathways for iNOS-mediated toxicity in vitro dependent on neuronal maturation and NMDA receptor expression." *Journal of Neurochemistry* 82(2): 269-282.
- Grozdanic, S. D., H. Kecova, M. M. Harper, W. Nilaweera, M. H. Kuehn und R. H. Kardon (2010). "Functional and structural changes in a canine model of hereditary primary angle-closure glaucoma." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 51(1): 255-263.
- Gstraunthaler, G. und T. Lindl, Eds. (2013). *Zell- und Gewebekultur, Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*, Springer-Verlag, Berlin, 7. Auflage, ISBN: 978-3-642-33112-1
- Gupta, D. und P. P. Chen (2016). "Glaucoma." *American Family Physician* 93(8): 668-674.
- Gusel'nikova, V. V. und D. E. Korzhevskiy (2015). "NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker." *Acta Naturae* 7(2): 42-47.
- Haefliger, I. O., E. Dettmann, R. Liu, P. Meyer, C. Prunte, J. Messerli und J. Flammer (1999). "Potential role of nitric oxide and endothelin in the pathogenesis of glaucoma." *Survey of Ophthalmology* 43 Suppl 1: S51-58.
- Hendrickson, A. und D. Hicks (2002). "Distribution and density of medium- and short-wavelength selective cones in the domestic pig retina." *Experimental Eye Research* 74(4): 435-444.
- Himori, N., K. Yamamoto, K. Maruyama, M. Ryu, K. Taguchi, M. Yamamoto und T. Nakazawa (2013). "Critical role of Nrf2 in oxidative stress-induced retinal ganglion cell death." *Journal of Neurochemistry* 127(5): 669-680.
- Huang, B. W., M. Miyazawa und Y. Tsuji (2014). "Distinct regulatory mechanisms of the human ferritin gene by hypoxia and hypoxia mimetic cobalt chloride at the transcriptional and post-transcriptional levels." *Cell Signal* 26(12): 2702-2709.
- Huang, L. E., J. Gu, M. Schau und H. F. Bunn (1998). "Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(14): 7987-7992.

- Hughes, A. (1975). "A quantitative analysis of the cat retinal ganglion cell topography." *Journal of comparative neurology*: 107-128.
- Hurst, J., S. Kuehn, A. Jashari, T. Tsai, K. U. Bartz-Schmidt, S. Schnichels und S. C. Joachim (2017). "A novel porcine ex vivo retina culture model for oxidative stress induced by H₂O₂." *Alternatives to Laboratory Animals* 45(1): 11-25.
- Hurst, J., A.M. Mueller-Buehl, L. Hofmann, S. Kuehn, F. Herms, S. Schnichels und S.C. Joachim (2020). "iNOS driven neuroprotection in a porcine retina organ culture model." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 24(7): 4312-4323
- Ju, W. K., M. S. Shim, K. Y. Kim, J. H. Bu, T. L. Park, S. Ahn und R. N. Weinreb (2018). "Ubiquinol promotes retinal ganglion cell survival and blocks the apoptotic pathway in ischemic retinal degeneration." *Biochemical and Biophysical Research Communication* 503(4): 2639-2645.
- Kallberg, M. E., D. E. Brooks, G. A. Garcia-Sanchez, A. M. Komaromy, N. J. Szabo und L. Tian (2002). "Endothelin 1 levels in the aqueous humor of dogs with glaucoma." *Journal of Glaucoma* 11(2): 105-109.
- Kobuch, K., W. A. Herrmann, C. Framme, H. G. Sachs, V. P. Gabel und J. Hillenkamp (2008). "Maintenance of adult porcine retina and retinal pigment epithelium in perfusion culture: characterisation of an organotypic in vitro model." *Experimental Eye Research* 86(4): 661-668.
- Komaromy, A. M., D. E. Brooks, P. S. Kubilis, W. W. Dawson, H. L. Sapp, Jr., G. Nelson, B. R. Collins und M. B. Sherwood (1998). "Diurnal intraocular pressure curves in healthy rhesus macaques (*Macaca mulatta*) and rhesus macaques with normotensive and hypertensive primary open-angle glaucoma." *Journal of Glaucoma* 7(2): 128-131.
- Krishnamoorthy, R. R., A. F. Clark, D. Daudt, J. K. Vishwanatha und T. Yorio (2013). "A forensic path to RGC-5 cell line identification: lessons learned." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 54(8): 5712-5719.
- Kuehn, S., J. Hurst, A. Jashari, K. Ahrens, T. Tsai, I. M. Wunderlich, H. B. Dick, S. C. Joachim und S. Schnichels (2016). "The novel induction of retinal ganglion cell apoptosis in porcine organ culture by NMDA - an opportunity for the replacement of animals in experiments." *Alternatives to Laboratory Animals* 44(6): 557-568.
- Kuehn, S., J. Hurst, F. Rensinghoff, T. Tsai, S. Grauthoff, Y. Satgunarajah, H. B. Dick, S. Schnichels und S. C. Joachim (2017). "Degenerative effects of cobalt-chloride treatment on neurons and microglia in a porcine retina organ culture model." *Experimental Eye Research* 155: 107-120.
- Kwong, J. M., J. Caprioli und N. Piri (2010). "RNA binding protein with multiple splicing: a new marker for retinal ganglion cells." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 51(2): 1052-1058.
- LaManna, J. C., J. C. Chavez und P. Pichiule (2004). "Structural and functional adaptation to hypoxia in the rat brain." *Journal of Experimental Biology* 207(Pt 18): 3163-3169.
- Laszlo, F. und B. J. Whittle (1997). "Actions of isoform-selective and non-selective nitric oxide synthase inhibitors on endotoxin-induced vascular leakage in rat colon." *European Journal of Pharmacology* 334(1): 99-102.
- Lenaz, G. und M. L. Genova (2009). "Mobility and function of coenzyme Q (ubiquinone) in the mitochondrial respiratory chain." *Biochimica et Biophysica Acta* 1787(6): 563-573.
- Li, L., J. Du, Y. Lian, Y. Zhang, X. Li, Y. Liu, L. Zou und T. Wu (2016). "Protective Effects of Coenzyme Q10 Against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress in PC12 Cell: The Role of Nrf2 and Antioxidant Enzymes." *Cellular and Molecular Neurobiology* 36(1): 103-111.
- Liebich, H.-G., König, H.E., Ed. (2012). *Sehorgan (Organum visus)*. In: König, H.E., Liebich, H.-G., 5. Aufl., *Anatomie der Haussäugetiere*. Stuttgart, Schattauer Verlag.

- Liu, B. und A. H. Neufeld (2000). "Expression of nitric oxide synthase-2 (NOS-2) in reactive astrocytes of the human glaucomatous optic nerve head." *Glia* 30(2): 178-186.
- Lulli, M., E. Witort, L. Papucci, E. Torre, C. Schipani, C. Bergamini, M. Dal Monte und S. Capaccioli (2012). "Coenzyme Q10 instilled as eye drops on the cornea reaches the retina and protects retinal layers from apoptosis in a mouse model of kainate-induced retinal damage." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 53(13): 8295-8302.
- Maher, P. und A. Hanneken (2005). "The molecular basis of oxidative stress-induced cell death in an immortalized retinal ganglion cell line." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 46(2): 749-757.
- Majmundar, A. J., W. J. Wong und M. C. Simon (2010). "Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress." *Molecular Cell* 40(2): 294-309.
- Maliha, A. M. (2017). "Vergleich von potentiell protektiven Substanzen in der Schweineretina-Organokultur", Experimental Eye Research Institute Bochum, Ruhr Universität Bochum, Masterarbeit, Seitenanzahl: 98
- Mander, P. K., A. Jekabsone und G. C. Brown (2006). "Microglia proliferation is regulated by hydrogen peroxide from NADPH oxidase." *Journal of Immunology* 176(2): 1046-1052.
- McLellan, G. J. und P. E. Miller (2011). "Feline glaucoma--a comprehensive review." *Veterinarian Ophthalmology* 14 Suppl 1: 15-29.
- Merck. "1400W dihydrochloride.", aufgerufen am 07.07.2019 um 16:09 unter <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/w4262?lang=de®ion=DE>.
- Michalska, M., G. Wolf, R. Walther und P. Newsholme (2010). "Effects of pharmacological inhibition of NADPH oxidase or iNOS on pro-inflammatory cytokine, palmitic acid or H₂O₂-induced mouse islet or clonal pancreatic beta-cell dysfunction." *Bioscience Reports* 30(6): 445-453.
- Nadal-Nicolas, F. M., M. Jimenez-Lopez, P. Sobrado-Calvo, L. Nieto-Lopez, I. Canovas-Martinez, M. Salinas-Navarro, M. Vidal-Sanz und M. Agudo (2009). "Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 50(8): 3860-3868.
- Nakajima, Y., Y. Inokuchi, M. Nishi, M. Shimazawa, K. Otsubo und H. Hara (2008). "Coenzyme Q10 protects retinal cells against oxidative stress in vitro and in vivo." *Brain Research* 1226: 226-233.
- Nell, B., Walde, I., Ed. (2017). *Augenkrankheiten*. In: Kohn, B., Schwarz, G., 12. Aufl., *Praktikum der Hundeklinik*. Stuttgart, Enke Verlag.
- Neufeld, A. H., S. Das, S. Vora, E. Gachie, S. Kawai, P. T. Manning und J. R. Connor (2002). "A prodrug of a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase is neuroprotective in the rat model of glaucoma." *Journal of Glaucoma* 11(3): 221-225.
- Neufeld, A. H., A. Sawada und B. Becker (1999). "Inhibition of nitric-oxide synthase 2 by aminoguanidine provides neuroprotection of retinal ganglion cells in a rat model of chronic glaucoma." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(17): 9944-9948.
- Nucci, C., R. Tartaglione, A. Cerulli, R. Mancino, A. Spano, F. Cavaliere, L. Rombola, G. Bagetta, M. T. Corasaniti und L. A. Morrone (2007). "Retinal damage caused by high intraocular pressure-induced transient ischemia is prevented by coenzyme Q10 in rat." *International Review of Neurobiology* 82: 397-406.
- Ofri, R. und K. Narfstrom (2007). "Light at the end of the tunnel? Advances in the understanding and treatment of glaucoma and inherited retinal degeneration." *Veterinarian Journal* 174(1): 10-22.

- Pang, I. H., E. C. Johnson, L. Jia, W. O. Cepurna, A. R. Shepard, M. R. Hellberg, A. F. Clark und J. C. Morrison (2005). "Evaluation of inducible nitric oxide synthase in glaucomatous optic neuropathy and pressure-induced optic nerve damage." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 46(4): 1313-1321.
- Parmentier, S., G. A. Bohme, D. Lerouet, D. Damour, J. M. Stutzmann, I. Margail und M. Plotkine (1999). "Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents ischaemic brain injury." *Br Journal of Pharmacology* 127(2): 546-552.
- Pizzirani, S. (2015). "Definition, Classification, and Pathophysiology of Canine Glaucoma." *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 45(6): 1127-1157, v.
- Pumphrey, S. (2015). "Canine Secondary Glaucomas." *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 45(6): 1335-1364, vii.
- Quigley, H. A. und A. T. Broman (2006). "The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020." *British Journal of Ophthalmology* 90(3): 262-267.
- Ray, P. D., B. W. Huang und Y. Tsuji (2012). "Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling." *Cell Signal* 24(5): 981-990.
- Reiß, F. (2018) "Therapeutischer Eingriff in die intrazellulären Prozesse in der durch chemische Hypoxie geschädigten Schweineretina-Organokultur" aus dem Experimental Eye Research Institute der Ruhr Universität Bochum und dem Fachbereich Bioanalytik der Hochschule Coburg, Bachelorarbeit, Seitenanzahl: 63.
- Reiter, M., K. Rupp, P. Baumeister, S. Zieger und U. Harreus (2009). "Antioxidant effects of quercetin and coenzyme Q10 in mini organ cultures of human nasal mucosa cells." *Anticancer Research* 29(1): 33-39.
- Richard, D. E., E. Berra und J. Pouyssegur (2000). "Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 α in vascular smooth muscle cells." *Journal of Biological Chemistry* 275(35): 26765-26771.
- Rodriguez, A. R., L. P. de Sevilla Muller und N. C. Brecha (2014). "The RNA binding protein RBPMS is a selective marker of ganglion cells in the mammalian retina." *Journal of Comparative Neurology* 522(6): 1411-1443.
- Roska, B. und M. Meister (2014). "The Retina Dissects the Visual Scene into Distinct Features." *The New Visual Neurosciences*.
- Rosselli, M., P. J. Keller und R. K. Dubey (1998). "Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction." *Human Reproduction Update* 4(1): 3-24.
- Rus, A., L. Castro, M. L. Del Moral und A. Peinado (2010). "Inducible NOS inhibitor 1400W reduces hypoxia/re-oxygenation injury in rat lung." *Redox Report* 15(4): 169-178.
- Sacca, S. C. und A. Izzotti (2008). "Oxidative stress and glaucoma: injury in the anterior segment of the eye." *Progress in Brain Research* 173: 385-407.
- Salomon, F.-V., Simoens, P., Ed. (2020). *Sehorgan (Organum visus)*. In: Salomon, F.-V., 4. Aufl., *Anatomie für die Tiermedizin*. Stuttgart, Thieme Verlag.
- Sanes, J. R. und R. H. Masland (2015). "The Types of Retinal Ganglion Cells: Current Status and Implications for Neuronal Classification." *Annual Review of Neuroscience* 38(1): 221-246.
- Schmidt, P., Wohlsein, P., Ed. (2020). *Augen*. In: Baumgärtner, W., Gruber, A. D., zweite Aufl., „Spezielle Pathologie für die Tiermedizin“. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Schmitz, S., Ed. (2011). *Zellkultur, Zelllinien und deren Einsatzmöglichkeiten, Kapitel 5*. In: Schmitz, S. *Der Experimentator: Zellkultur*. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.

- Semenza, G. L. (2003). "Targeting HIF-1 for cancer therapy." *Nature Reviews Cancer* 3(10): 721-732.
- Sennlaub, F., Y. Courtois und O. Goureau (2002). "Inducible nitric oxide synthase mediates retinal apoptosis in ischemic proliferative retinopathy." *Journal of Neuroscience* 22(10): 3987-3993.
- Shareef, S., A. Sawada und A. H. Neufeld (1999). "Isoforms of nitric oxide synthase in the optic nerves of rat eyes with chronic moderately elevated intraocular pressure." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 40(12): 2884-2891.
- Shen, G., S. Link, S. Kumar, D. M. Nusbaum, D. Y. Tse, Y. Fu, S. M. Wu und B. J. Frankfort (2018). "Characterization of Retinal Ganglion Cell and Optic Nerve Phenotypes Caused by Sustained Intracranial Pressure Elevation in Mice." *Science Reports* 8(1): 2856.
- Shi, Q., X. Liu, N. Wang, X. Zheng, J. Ran, Z. Liu, J. Fu und J. Zheng (2017). "1400W ameliorates acute hypobaric hypoxia/reoxygenation-induced cognitive deficits by suppressing the induction of inducible nitric oxide synthase in rat cerebral cortex microglia." *Behavioural Brain Research* 319: 188-199.
- Skeie, J. M., S. H. Tsang und V. B. Mahajan (2011). "Evisceration of mouse vitreous and retina for proteomic analyses." *Journal of Visualized Experiments*(50).
- Song, B. J. und J. Caprioli (2014). "New directions in the treatment of normal tension glaucoma." *Indian Journal of Ophthalmology* 62(5): 529-537.
- Stades, F. C., Neumann, W., Michael H.,Boevé, M., Spiess, B.,Wyman (2006). *Praktische Augenheilkunde für den Tierarzt*. Hannover, Schlütersche Vertragsgesellschaft mbH u. Co. KG.
- Tham, Y. C., X. Li, T. Y. Wong, H. A. Quigley, T. Aung und C. Y. Cheng (2014). "Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis." *Ophthalmology* 121(11): 2081-2090.
- Trick, G. L. (1993). "Visual dysfunction in normotensive glaucoma." *Documenta Ophthalmology* 85(2): 125-133.
- Ulfig, N. (2005). *Nervensystem und Sinnesorgane, Kapitel 13, 215-221*. In: Ulfig, N. *Kurzlehrbuch Histologie*, Stuttgart, Thieme Verlag.
- Van Bergen, N. J., J. P. Wood, G. Chidlow, I. A. Trounce, R. J. Casson, W. K. Ju, R. N. Weinreb und J. G. Crowston (2009). "Recharacterization of the RGC-5 retinal ganglion cell line." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 50(9): 4267-4272.
- van Uden, P., N. S. Kenneth und S. Rocha (2008). "Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB." *Biochemical Journal* 412(3): 477-484.
- Veal, E. A., A. M. Day und B. A. Morgan (2007). "Hydrogen peroxide sensing and signaling." *Molecular Cell* 26(1): 1-14.
- Wang, S., G. Irving, L. Jiang, H. Wang, M. Li, X. Wang, W. Han, Y. Xu, Y. Yang, T. Zeng, F. Song, X. Zhao und K. Xie (2017). "Oxidative Stress Mediated Hippocampal Neuron Apoptosis Participated in Carbon Disulfide-Induced Rats Cognitive Dysfunction." *Neurochemical Research* 42(2): 583-594.
- Welsch, U. (2006). *Sehorgan, Kapitel 17.2*, In: Welsch, U., 2. Aufl., *Lehrbuch Histologie*, Amsterdam, Elsevier.
- Winterbourn, C. C. (2013). "The biological chemistry of hydrogen peroxide." *Methods in Enzymology* 528: 3-25.
- Wu, D. und P. Yotnda (2011). "Induction and testing of hypoxia in cell culture." *Journal of Visualized Experiments*(54).

- Xiang, M., L. Zhou, J. P. Macke, T. Yoshioka, S. H. Hendry, R. L. Eddy, T. B. Shows und J. Nathans (1995). "The Brn-3 family of POU-domain factors: primary structure, binding specificity, and expression in subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons." *Journal of Neuroscience* 15(7 Pt 1): 4762-4785.
- Yan, D. B., F. M. Coloma, A. Metheerairut, G. E. Trope, J. G. Heathcote und C. R. Ethier (1994). "Deformation of the lamina cribrosa by elevated intraocular pressure." *British Journal of Ophthalmology* 78(8): 643-648.
- Yang, X., Y. Zhang, H. Xu, X. Luo, J. Yu, J. Liu und R. C. Chang (2016). "Neuroprotection of Coenzyme Q10 in Neurodegenerative Diseases." *Current Topics in Medical Chemistry* 16(8): 858-866.
- Yuan, Y., G. Hilliard, T. Ferguson und D. E. Millhorn (2003). "Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha." *Journal of Biological Chemistry* 278(18): 15911-15916.
- Zhang, X., A. M. Tohari, F. Marcheggiani, X. Zhou, J. Reilly, L. Tiano und X. Shu (2017). "Therapeutic Potential of Co-enzyme Q10 in Retinal Diseases." *Current Medical Chemistry* 24(39): 4329-4339.
- Zhu, Y., D. Nikolic, R. B. Van Breemen und R. B. Silverman (2005). "Mechanism of inactivation of inducible nitric oxide synthase by amidines. Irreversible enzyme inactivation without inactivator modification." *Journal of American Chemical Society* 127(3): 858-868.
- Zitzler, J. (2004). *Oxidativer Stress-assoziiertes neuronales Zelltod und die Identifikation neuroprotektiver Gene durch ein neuartiges Screening-System*. Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, München, Dissertation, Seitenanzahl: 121
- Zou, M., S. Li, W. H. Klein und M. Xiang (2012). "Brn3a/Pou4f1 regulates dorsal root ganglion sensory neuron specification and axonal projection into the spinal cord." *Developmental Biology* 364(2): 114-127.

9. Anhang

9.1. iNOS-Inhibitor-Studien

Darstellung der Mittelwerte der gezählten RGZ/mm der iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses nach vier Tagen Kultivierung der Retinae (Anti-NeuN)

Gruppe	Retina-Nr.	Mittelwert (mm)
Kontrolle	12	34,66
Kontrolle	18	33,91
Kontrolle	24	30,14
Kontrolle	27	28,63
Kontrolle	30	34,66
Kontrolle	6	37,68
H ₂ O ₂	15	24,11
H ₂ O ₂	13	16,58
H ₂ O ₂	20	18,84
H ₂ O ₂	17	19,59
H ₂ O ₂	22	23,36
H ₂ O ₂	28	25,62
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	14	29,39
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	19	33,16
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	16	21,85
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	21	30,74
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	23	27,13
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	29	44,46

Tabelle 12: Mittelwerte der Zellen/mm der iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses, vier Tage, n=6, Anti-NeuN

Darstellung der Standardfehler der iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses nach vier Tagen Kultivierung der Retinae (Anti-NeuN)

Gruppe	Mittelwert (mm)	Standardfehler
Kontrolle	33,28	1,35
H ₂ O ₂	21,35	1,44
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	31,12	3,09

Tabelle 13: Standardfehler der iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses, vier Tage, n=6, Anti-NeuN

Darstellung der p-Werte der iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses nach vier Tagen Kultivierung der Retinae (Anti-NeuN)

Gruppe/p-Wert	Kontrolle	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.
Kontrolle	-	0,003	0,76
H ₂ O ₂	0,003	-	0,01
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	0,76	0,01	-

Tabelle 14: p-Werte der iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses, vier Tage, n=6, Anti-NeuN

Darstellung der Mittelwerte der gezählten RGZ/mm im Modell des oxidativen Stresses nach vier Tagen Kultivierung der Retinae (Anti-RBPMS)

Gruppe	Retina-Nr.	Mittelwert (mm)	Ausreißer
Kontrolle	6	32,55	
Kontrolle	12	31,25	
Kontrolle	18	41,33	
Kontrolle	24	40,03	
Kontrolle	27	44,59	
Kontrolle	30	45,57	
Kontrolle	36	36,13	
Kontrolle	42	48,82	
Kontrolle	45	41,33	
Kontrolle	46	53,05	
H ₂ O ₂	13	27,67	
H ₂ O ₂	15	19,20	
H ₂ O ₂	17	16,27	
H ₂ O ₂	20	13,02	
H ₂ O ₂	22	30,92	
H ₂ O ₂	28	15,95	
H ₂ O ₂	37	26,04	
H ₂ O ₂	39	27,01	
H ₂ O ₂	41	17,58	
H ₂ O ₂	44	15,62	
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	14	27,01	
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	16	36,45	
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	19	8,46	X
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	21	26,36	
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	23	40,36	
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	29	49,47	
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	38	39,06	
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	40	31,57	
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	49	30,92	
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	50	35,80	

Tabelle 15: Mittelwerte der RGZ/mm der iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses, vier Tage, n=9-10, Anti-RBPMS

Darstellung der Standardfehler der iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses nach vier Tagen Kultivierung der Retinae (Anti-RBPMS)

Gruppe	Mittelwert (mm)	Standardfehler
Kontrolle	41,47	2,19
H ₂ O ₂	20,93	2,00
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	35,22	2,43

Tabelle 16: Standardfehler der iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses, vier Tage, n=9-10, Anti-RBPMS

Darstellung der p-Werte der iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses nach vier Tagen Kultivierung (Anti-RBPMS)

Gruppe/p-Wert	Kontrolle	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.
Kontrolle	-	0,0001	0,15
H ₂ O ₂	0,00013	-	0,0005
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	0,15	0,0005	-

Tabelle 17: p-Werte der iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses, vier Tage, n=9-10, Anti-RBPMS

Darstellung der Mittelwerte der gezählten RGZ/mm der iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses nach acht Tagen Kultivierung der Retinae (Anti-RBPMS)

Gruppe	Retina-Nr.	Mittelwert (mm)
Kontrolle	12	40,03
Kontrolle	18	40,03
Kontrolle	24	24,41
Kontrolle	27	32,22
Kontrolle	32	44,26
Kontrolle	35	31,90
Kontrolle	41	51,42
Kontrolle	43	26,36
Kontrolle	49	32,55
Kontrolle	6	35,80
H ₂ O ₂	33	27,99
H ₂ O ₂	44	17,25
H ₂ O ₂	46	23,43
H ₂ O ₂	48	30,27
H ₂ O ₂	13	23,76
H ₂ O ₂	15	20,18
H ₂ O ₂	17	15,95
H ₂ O ₂	20	17,90
H ₂ O ₂	22	22,78
H ₂ O ₂	30	40,03
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	14	23,11
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	16	22,78
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	19	28,64
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	21	34,17
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	23	34,83
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	31	44,26
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	34	39,06
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	45	28,64
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	47	20,18
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	50	32,55

Tabelle 18: Mittelwerte der gezählten RGZ/mm der iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses, acht Tage, n=10, Anti-RBPMS

Darstellung der Standardfehler der iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses nach acht Tagen Kultivierung der Retinae (Anti-RBPMS)

Gruppe	Mittelwert (mm)	Standardfehler
Kontrolle	35,90	2,60
H ₂ O ₂	23,96	2,30
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	30,82	2,42

Tabelle 19: Standardfehler der iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses, acht Tage, n=10, Anti-RBPMS

Darstellung der p-Werte der iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses nach acht Tagen Kultivierung der Retinae (Anti-RBPMS)

Gruppe/p-Wert	Kontrolle	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.
Kontrolle	-	0,005	0,32
H ₂ O ₂	0,005	-	0,13
H ₂ O ₂ + iNOS-Inh.	0,32	0,13	-

Tabelle 20: p-Werte der iNOS-Inhibitorstudie im Modell des oxidativen Stresses, acht Tage, n=10, Anti-RBPMS

Darstellung der Mittelwerte der gezählten RGZ/mm der iNOS-Inhibitorstudie im Hypoxiemodell nach vier Tagen Kultivierung der Retinae (Anti-RBPMS)

Gruppe	Retina-Nr.	Mittelwert (mm)
Kontrolle	6	39,06
Kontrolle	12	33,20
Kontrolle	18	42,31
Kontrolle	24	36,13
Kontrolle	27	42,96
Kontrolle	30	42,31
Kontrolle	36	38,41
Kontrolle	42	43,29
Kontrolle	45	41,99
Kontrolle	46	40,36
CoCl ₂	1	24,41
CoCl ₂	3	20,50
CoCl ₂	5	15,62
CoCl ₂	8	41,01
CoCl ₂	10	35,80
CoCl ₂	25	19,20
CoCl ₂	31	32,55
CoCl ₂	33	23,11
CoCl ₂	35	23,11
CoCl ₂	43	20,83
CoCl ₂ + iNOS-Inh.	2	32,55
CoCl ₂ + iNOS-Inh.	4	27,34
CoCl ₂ + iNOS-Inh.	7	31,25
CoCl ₂ + iNOS-Inh.	9	23,11
CoCl ₂ + iNOS-Inh.	11	49,80
CoCl ₂ + iNOS-Inh.	26	35,48
CoCl ₂ + iNOS-Inh.	32	32,22
CoCl ₂ + iNOS-Inh.	34	37,43
CoCl ₂ + iNOS-Inh.	47	35,15
CoCl ₂ + iNOS-Inh.	48	34,83

Tabelle 21: Mittelwerte der gezählten RGZ/mm der iNOS-Inhibitorstudie im Hypoxiemodell, vier Tage, n=10, Anti-RBPMS

Darstellung der Standardfehler der iNOS-Inhibitorstudie im Hypoxiemodell nach vier Tagen Kultivierung der Retinae (Anti-RBPMS)

Gruppe	Mittelwert (mm)	Standardfehler
Kontrolle	40,00	1,05
CoCl ₂	25,62	2,57
CoCl ₂ + iNOS-Inh.	33,91	2,21

Tabelle 22: Standardfehler der iNOS-Inhibitorstudie im Hypoxiemodell, vier Tage, n=10, Anti-RBPMS

Darstellung der p-Werte der iNOS-Inhibitorstudie im Hypoxiemodell nach vier Tagen Kultivierung der Retinae (Anti-RBPMS)

Gruppe/p-Wert	Kontrolle	CoCl ₂	CoCl ₂ + iNOS-Inh.
Kontrolle	-	0,0002	0,11
CoCl ₂	0,0002	-	0,02
CoCl ₂ + iNOS-Inh.	0,11	0,02	-

Tabelle 23: p-Werte der iNOS-Inhibitorstudie im Hypoxiemodell, vier Tage, n=10, Anti-RBPMS

Darstellung der Mittelwerte der gezählten RGZ/mm der iNOS-Inhibitorstudie im Hypoxiemodell nach acht Tagen Kultivierung der Retinae (Anti-RBPMS)

Gruppe	Retina-Nr.	Mittelwert (mm)
Kontrolle	6	35,80
Kontrolle	12	40,03
Kontrolle	18	40,03
Kontrolle	24	24,41
Kontrolle	27	32,22
Kontrolle	32	44,26
Kontrolle	35	31,90
Kontrolle	41	51,42
Kontrolle	43	26,36
Kontrolle	49	32,55
CoCl ₂	1	21,48
CoCl ₂	3	20,18
CoCl ₂	5	17,58
CoCl ₂	8	23,76
CoCl ₂	10	16,60
CoCl ₂	25	19,20
CoCl ₂	28	21,16
CoCl ₂	36	15,30
CoCl ₂	38	22,78
CoCl ₂	40	16,60
CoCl ₂ + iNOS-Inh.	2	29,944
CoCl ₂ + iNOS-Inh.	4	23,80
CoCl ₂ + iNOS-Inh.	7	23,80
CoCl ₂ + iNOS-Inh.	9	28,32
CoCl ₂ + iNOS-Inh.	11	42,31
CoCl ₂ + iNOS-Inh.	26	27,01
CoCl ₂ + iNOS-Inh.	29	30,59
CoCl ₂ + iNOS-Inh.	37	33,20
CoCl ₂ + iNOS-Inh.	39	22,46
CoCl ₂ + iNOS-Inh.	42	24,08

Tabelle 24: Mittelwerte der gezählten RGZ/mm der iNOS-Inhibitorstudie im Hypoxiemodell, acht Tage, n=10, Anti-RBPMS

Darstellung der Standardfehler der iNOS-Inhibitorstudie im Hypoxiemodell nach acht Tagen Kultivierung der Retinae (Anti-RBPMS)

Gruppe	Mittelwert (mm)	Standardfehler
Kontrolle	35,90	2,60
CoCl ₂	19,46	0,91
CoCl ₂ + iNOS-Inh.	28,54	1,89

Tabelle 25: Standardfehler der iNOS-Inhibitorstudie im Hypoxiemodell, acht Tage, n=10, Anti-RBPMS

Darstellung der p-Werte der iNOS-Inhibitorstudie im Hypoxiemodell nach acht Tagen Kultivierung der Retinae (Anti-RBPMS)

Gruppe/p-Wert	Kontrolle	CoCl₂	CoCl₂ + iNOS-Inh.
Kontrolle	-	0,0001	0,03
CoCl ₂	0,0001	-	0,007
CoCl ₂ + iNOS-Inh.	0,03	0,007	-

Tabelle 26: p-Werte der iNOS-Inhibitorstudie im Hypoxiemodell, acht Tage, n=10, Anti-RBPMS

9.2. Coenzym Q10-Studien:

Darstellung der Mittelwerte der gezählten RGZ/mm² im Modell des oxidativen Stresses nach vier Tagen Kultivierung der Retinae mit 100 µM CoQ10 (Anti-RBPMS)

Gruppe	Retina-Nr.	Mittelwert (mm ²)	Ausreißer
Kontrolle	1	729,01	
Kontrolle	5	196,30	X
Kontrolle	9	685,56	
Kontrolle	13	455,54	
Kontrolle	17	451,79	
H ₂ O ₂	2	292,95	
H ₂ O ₂	6	325,92	
H ₂ O ₂	10	317,68	
H ₂ O ₂	14	1072,91	X
H ₂ O ₂	18	358,89	
Lutrol	3	542,45	
Lutrol	7	437,56	
Lutrol	11	420,32	
Lutrol	15	325,17	
Lutrol	19	465,28	
100 µM CoQ10	4	392,60	
100 µM CoQ10	8	432,31	
100 µM CoQ10	12	188,06	
100 µM CoQ10	16	242,75	
100 µM CoQ10	20	944,79	X

Tabelle 27: Mittelwerte der gezählten RGZ/mm² der 100 µM CoQ10-Studie im Modell des oxidativen Stresses, vier Tage, n=4-5, Anti-RBPMS

Darstellung der Standardfehler im Modell des oxidativen Stresses nach vier Tagen Kultivierung der Retinae mit 100 μM CoQ10 (Anti-RBPMS)

Gruppe	Mittelwert (mm^2)	Standardfehler
Kontrolle	580,48	73,75
H ₂ O ₂	323,86	13,62
Lutrol	438,16	35,14
100 μM CoQ10	313,93	58,53

Tabelle 28: Standardfehler der 100 μM CoQ10-Studie im Modell des oxidativen Stresses, vier Tage, n=4-5, Anti-RBPMS

Darstellung der p-Werte im Modell des oxidativen Stresses nach vier Tagen Kultivierung der Retinae mit 100 μM CoQ10 (Anti-RBPMS)

Gruppe/p-Wert	Kontrolle	H ₂ O ₂	Lutrol	100 μM CoQ10
Kontrolle	-	0,02	0,24	0,01
H ₂ O ₂	0,02	-	0,41	0,99
Lutrol	0,24	0,41	-	0,35
100 μM CoQ10	0,012	0,99	0,35	-

Tabelle 29: p-Werte der 100 μM CoQ10-Studie im Modell des oxidativen Stresses, vier Tage, n=4-5, Anti-RBPMS

Darstellung der Mittelwerte der gezählten RGZ/mm² im Modell des oxidativen Stresses nach vier Tagen Kultivierung der Retinae mit 300 µM CoQ10(Anti-RBPMS)

Gruppe	Retina-Nr.	Mittelwert (mm ²)	Ausreißer
Kontrolle	12	629,36	
Kontrolle	14	185,81	
Kontrolle	18	672,07	
Kontrolle	2	386,61	
Kontrolle	6	1072,91	X
Kontrolle	8	425,57	
H ₂ O ₂	1	383,61	
H ₂ O ₂	11	481,01	
H ₂ O ₂	13	653,34	X
H ₂ O ₂	17	414,33	
H ₂ O ₂	5	297,45	
H ₂ O ₂	7	379,12	
Lutrol	10	648,09	
Lutrol	16	447,30	
Lutrol	19	518,48	
Lutrol	21	1362,87	X
Lutrol	23	695,30	
300 µM CoQ10	15	247,99	X
300 µM CoQ10	20	513,23	
300 µM CoQ10	22	338,66	
300 µM CoQ10	24	259,99	
300 µM CoQ10	3	476,52	
300 µM CoQ10	9	433,81	

Tabelle 30: Mittelwerte der gezählten RGZ/mm² der 300 µM CoQ10-Studie im Modell des oxidativen Stresses, vier Tage, n=4, Anti-RBPMS

Darstellung der Standardfehler im Modell des oxidativen Stresses nach vier Tagen Kultivierung der Retinae mit 300 μM CoQ10(Anti-RBPMS)

Gruppe	Mittelwert (mm^2)	Standardfehler
Kontrolle	459,89	88,15
H ₂ O ₂	391,10	29,66
Lutrol	577,29	57,23
300 μM CoQ10	404,44	46,42

Tabelle 31: Standardfehler der 300 μM CoQ10-Studie im Modell des oxidativen Stresses, vier Tage, $n=4$, Anti-RBPMS

Darstellung der p-Werte im Modell des oxidativen Stresses nach vier Tagen Kultivierung der Retinae mit 300 μM CoQ10(Anti-RBPMS)

Gruppe/p-Wert	Kontrolle	H ₂ O ₂	Lutrol	300 μM CoQ10
Kontrolle	-	0,84	0,59	0,91
H ₂ O ₂	0,84	-	0,23	0,99
Lutrol	0,59	0,23	-	0,28
300 μM CoQ10	0,91	0,99	0,28	-

Tabelle 32: p-Werte der 300 μM CoQ10-Studie im Modell des oxidativen Stresses, vier Tage, $n=4$, Anti-RBPMS

10. Danksagung

Einen herzlichen Dank möchte ich zunächst meiner Betreuerin an der FU Berlin, Frau Prof. Dr. Plendl für die Übernahme der Betreuung meiner externen Dissertation aussprechen.

Ein ebenso großer Dank geht an Frau PD Dr. Stephanie Joachim für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Frau PD Dr. Merle vom Institut für Veterinär-Epidemiologie und Biometrie für die gute und nette statistische Beratung bedanken, die, aufgrund der weiten Entfernung nach Berlin in ihrem Privathaus stattfinden dürfte. Ein weiterer Dank gilt Hr. Dr. Ripp für die Beratung zum Aufbau meines Literaturverzeichnisses.

Des Weiteren möchte ich Ana Maria Müller-Bühl für die intensive Betreuung meiner Doktorarbeit danken. Sie hatte stets ein offenes Ohr für Fragen und Probleme und konnte einem immer wieder, sowohl vor, als auch nach Übernahme der Betreuung dieser Doktorarbeit, mit Rat und Tat zur Seite stehen. Dr. Sandra Kühn danke ich für die gute Betreuung der Anfangsphase dieser Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich mich bei der gesamten Forschungsgruppe des Experimental Eye Research Instituts für die schöne Zeit bedanken. Ein besonderer Dank hierbei geht an Fenja, Fabienne, Johanna, Virginia und Moe, mit denen ich im Labor und im Büro viel Spaß hatte. Auch gilt mein Dank natürlich allen weiteren Studenten des EERI, durch die mir die experimentelle Zeit der Doktorarbeit in guter Erinnerung bleiben wird.

Auch meinen Freunden möchte ich danken, die trotz meiner ständigen Abwesenheit immer für mich da waren. Insbesondere möchte ich mich hierbei bei Lena und Franzi bedanken, die immer für die nötige Ablenkung sorgen konnten.

Meinem Freund Robin möchte ich dafür danken, dass er mich während meiner Doktorarbeit immer unterstützt hat.

Der größte Dank geht allerdings an meine Eltern, Uta und Michael, die mir nicht nur das Studium und die Promotion ermöglicht haben, sondern mir auch so immer zur Seite standen und stehen.

11. Finanzierungsquellen und Interessenskonflikte

Diese Arbeit wurde finanziell unterstützt durch die Stiftung zur Förderung der Erforschung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Einschränkung von Tierversuchen (SET Founding), sowie der FoRUM Forschungsförderung der medizinischen Fakultät der Ruhr Universität Bochum.

Es besteht kein Interessenskonflikt durch finanzielle Unterstützung der Arbeiten.

12. Publikationen

José Hurst, Ana Maria Mueller-Buehl, Lisa Hofmann, Sandra Kuehn, Fenja Herms, Sven Schnichels und Stephanie Christine Joachim.

„iNOS inhibitor driven neuroprotection in a porcine retina organ culture model.”

Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2020 Apr;24(7):4312-4323., PMID: 32130787

Ana Maria Mueller-Buehl, Theresa Tsai, José Hurst, Carsten Theiss, Laura Peters, Lisa Hofmann, Fenja Herms, Sandra Kuehn, Sven Snichels, Stephanie Christine Joachim.

“Reduced retinal degeneration in an oxidative stress organ culture model though an iNOS-inhibitor”

Biology (Basel), 2021 Apr 28;10(5):383, PMID: 33925248

13. Erklärung

Ich erkläre gegenüber der Freien Universität Berlin, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Die vorliegende Arbeit ist frei von Plagiaten. Alle Ausführungen, die wörtlich oder inhaltlich aus anderen Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität als Prüfungsleistung eingereicht.

Lisa Hofmann, 15.12.2021



9 783967 291490

mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-149-0