

DISSERTATION

Geschlechtsspezifische Untersuchung von Pathologie und Immunantwort in einem Mausmodell für Choroidale Neovaskularisation

*sex- related differences in pathology and immune response in a mouse model for choroidal neovascularization*

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Petra Claudia Althoff

Erstbetreuung: Prof. Dr. med. Antonia Jousen

Datum der Promotion: 29.11.2024

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>- 4 -</b>
<b>2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>- 5 -</b>
<b>3</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>- 6 -</b>
<b>4</b>	<b>Abstract: Deutsch</b> .....	<b>- 7 -</b>
<b>5</b>	<b>Abstract: Englisch</b> .....	<b>- 8 -</b>
<b>6</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>- 9 -</b>
6.1	<i>Exsudative Altersbedingte Makuladegeneration (AMD)</i> .....	- 9 -
6.1.1	Epidemiologie und Kosten für das Gesundheitssystem .....	- 9 -
6.1.2	Pathogenese .....	- 10 -
6.1.3	Klinische Manifestation .....	- 12 -
6.1.4	Zusammenhang zwischen Geschlecht und Erkrankung.....	- 14 -
6.2	<i>Immunzellen der Retina</i> .....	- 15 -
6.2.1	Mikroglia und Makroglia .....	- 16 -
6.2.2	Bedeutung bei der Altersbedingten Makuladegeneration .....	- 17 -
6.2.3	Geschlechtsspezifische Unterschiede.....	- 18 -
6.3	<i>Tiermodelle zur Untersuchung der exsudativen AMD</i> .....	- 20 -
6.3.1	Laser-induzierte Choroidale Neovaskularisation (CNV).....	- 20 -
6.3.2	Tierexperimente und Geschlechtsspezifität.....	- 21 -
6.4	<i>Zielsetzung der Arbeit</i> .....	- 22 -
<b>7</b>	<b>Material und Methodik</b> .....	<b>- 23 -</b>
7.1	<i>Materialien</i> .....	- 23 -
7.1.1	Verwendete Mäuse .....	- 23 -
7.1.2	Anästhesie und Augenmedikation.....	- 23 -
7.1.3	Verwendete Antikörper .....	- 23 -
7.1.4	Chemikalien, Puffer und Lösungen.....	- 24 -
7.1.5	Geräte .....	- 25 -
7.1.6	Software.....	- 26 -
7.2	<i>Methoden</i> .....	- 26 -
7.2.1	Laserkoagulation .....	- 26 -
7.2.2	Bildgebung in vivo .....	- 27 -
7.2.3	Immunhistochemische Färbung von Retinasagittalschnitten .....	- 28 -
7.2.4	Quantifizierung der GFAP- und VEGF-A-Expression .....	- 29 -
7.2.5	Herstellung und Immunhistochemische Färbung von Flachpräparaten .....	- 30 -
7.2.6	Quantifizierung von Iba-1- und P2Y12-positiven Zellen.....	- 31 -
7.2.7	Quantifizierung der laserinduzierten CNV ex vivo.....	- 33 -
7.2.8	Statistische Auswertung .....	- 34 -
<b>8</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>- 34 -</b>
8.1	<i>Experimentelles Design</i> .....	- 35 -
8.2	<i>Bildgebung der Pathologie</i> .....	- 37 -

8.3	<i>GFAP- und VEGF-A- Expression</i> .....	- 41 -
8.4	<i>Dichte der Mikroglia</i> .....	- 42 -
8.5	<i>Quantifizierung der CNV</i> .....	- 44 -
<b>9</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>- 45 -</b>
9.1	<i>Zusammenfassung der Hauptergebnisse</i> .....	- 45 -
9.2	<i>Diskussion der Methodik</i> .....	- 46 -
9.2.1	<i>Laserkoagulation</i> .....	- 46 -
9.2.2	<i>Quantifizierung der Pathologie mittels Bildgebung</i> .....	- 47 -
9.2.3	<i>Immunhistochemische Färbung der Retinasagittalschnitte</i> .....	- 48 -
9.2.4	<i>Immunhistochemische Färbung der Flachpräparate</i> .....	- 49 -
9.2.5	<i>Experimentelles Design</i> .....	- 50 -
9.3	<i>Diskussion der Ergebnisse</i> .....	- 51 -
9.3.1	<i>Bildgebung der Pathologie</i> .....	- 51 -
9.3.2	<i>GFAP- und VEGF-A- Expression</i> .....	- 52 -
9.3.3	<i>Dichte der Mikroglia</i> .....	- 55 -
9.3.4	<i>Quantifizierung der CNV</i> .....	- 57 -
9.4	<i>Schlussfolgerung und Ausblick</i> .....	- 57 -
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>- 59 -</b>
<b>11</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>- 71 -</b>
<b>12</b>	<b>Tabellarischer Lebenslauf</b> .....	<b>- 72 -</b>
<b>13</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>- 73 -</b>

# 1 Abkürzungsverzeichnis

Ang2 .....	Angiopoetin 2
ARVO.....	Association for research in vision and ophthalmology
BM.....	Basalmembran
BSA .....	bovines Serumalbumin
CD102 .....	Cluster of Differentiation 102
CNV .....	Choroidale Neovaskularisation
DAPI.....	4',6-Diamidino-2-phenylindol
GFAP .....	Gliafilament-Protein
Iba1 .....	ionisiertes Calcium-bindendes Adaptermolekül 1
ICAM-2 .....	intercellular adhesion molecule 2
IE .....	Internationale Einheit
IFN $\gamma$ .....	Interferon $\gamma$
ILM.....	Innere Grenzschrift
iNOS.....	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IPL .....	Innere Plexiforme Schicht
IR.....	Infrarot
IRF.....	intraretinale Flüssigkeit
M .....	Männchen
MNV.....	makuläre Neovaskularisation
NA .....	Nummerische Apertur
NaIO3 .....	Natriumiodat 3
OCT .....	Optische Kohärenztomographie
OLM .....	Äußere Grenzschrift
ONL.....	Äußere Körnerschrift
OPL .....	Äußere Plexiforme Schicht
P2RY12 .....	Purinerges Protein-G-gekoppelter Rezeptor P2Y12
PIGF .....	placental growth factor
RPE.....	Retinales Pigmentepithel
SEM.....	Standardfehler des Mittelwertes
SRF .....	subretinale Flüssigkeit

TIMPS .....	tissue inhibitor of metalloproteinases
VEGF .....	Endothelwachstumsfaktor
W .....	Weibchen

## 2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.</b> CNV bei exsudativer AMD.....	- 13 -
<b>Abbildung 2.</b> Analyse der Pathologie in den einzelnen Bildgebungsmodalitäten. ....	- 28 -
<b>Abbildung 3.</b> Schematische Darstellung zur Herstellung von Flachpräparaten.....	- 30 -
<b>Abbildung 4.</b> Verfahren zur Quantifizierung der Mikroglia-dichte auf retinalen Flachpräparaten. . .....	- 32 -
<b>Abbildung 5.</b> Strategie zur Quantifizierung des CNV-Volumens.....	- 33 -
<b>Abbildung 6.</b> Experimentelles Design. ....	- 35 -
<b>Abbildung 7.</b> Bildgebung im Zeitverlauf. ....	- 37 -
<b>Abbildung 8.</b> Übersicht der Ergebnisse in der Bildgebung.....	- 40 -
<b>Abbildung 9.</b> Färbung mit anti-VEGF-A und anti-GFAP. ....	- 42 -
<b>Abbildung 10.</b> Iba1-positive Zellen in der Retina.....	- 43 -
<b>Abbildung 11.</b> P2YR12-positive Zellen um laserinduzierte CNV auf choroidalen Flachpräparaten. .....	- 44 -
<b>Abbildung 12.</b> Färbung der laserinduzierten CNV mit Isolectin GS-IB <sub>4</sub> .....	- 45 -
<b>Abbildung 13.</b> Wiederholungsexperiment der anti-GFAP-Vimentin-Färbung innerhalb der Arbeitsgruppe. ....	- 54 -
<b>Abbildung 14.</b> Wiederholte anti-Iba1-Färbung und Analyse zeigt geschlechtsspezifische Mikroglia-dichte und -morphologie. ....	- 56 -

### 3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.</b> Internationale Klassifikation der makulären Neovaskularisation.....	- 13 -
<b>Tabelle 2.</b> Medikation.....	- 23 -
<b>Tabelle 3.</b> Antikörper.....	- 23 -
<b>Tabelle 4.</b> Chemikalien, Puffer und Lösungen .....	- 24 -
<b>Tabelle 5.</b> Geräte.....	- 25 -
<b>Tabelle 6.</b> Verwendete Software.....	- 26 -
<b>Tabelle 7.</b> Immunhistochemische Färbung von Retinasagittalschnitten .....	- 29 -
<b>Tabelle 8.</b> Immunhistochemische Färbung von Flatmounts.....	- 31 -

## 4 Abstract: Deutsch

**Hintergrund:** Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung einer geschlechtsspezifischen Antwort von Immunzellen, insbesondere von Mikro- und Makrogliazellen, im Tiermodell der laserinduzierten choroidalen Neovaskularisation (CNV). Mikrogliazellen zeigen physiologisch und in bedeutenden neurodegenerativen Erkrankungen geschlechtsspezifische Unterschiede in Morphologie und Funktion. Darüber hinaus wurde die Pathologie der CNV geschlechtsspezifisch in vivo und ex vivo betrachtet.

**Methoden:** Untersucht wurden 8 Wochen alte C57Bl/6J-Wildtyp-Mäuse beider Geschlechter. Die Laser-induzierte CNV wurde mittels Argonlaser mit jeweils einem Laserspot pro Netzhaut-Quadranten um den Sehnervkopf durchgeführt. Die Quantifizierung der Pathologie erfolgte in vivo 7 und 14 Tage nach Laser mittels bildgebender Methoden wie OCT, Fluoreszenz-Angiographie, Autofluoreszenz und Infrarotreflexion in verblendeter Form. 15 Tage nach Laser wurde ex vivo die Mikroglia-dichte in der Retina und Choroidea, das CNV-Volumen in der Choroidea sowie die Intensität an VEGF- und GFAP als Zeichen für Vaskulogenese und Gliazellaktivität manuell und verblindet als arithmetisches Mittel erfasst. Die immunhistologischen Färbungen wurden an Paraffinschnitten und Flachpräparaten mit den Antikörpern anti-Iba1, anti-P2YR12, anti-GFAP, anti-VEGF, anti- CD 102 und Isolectin B4 erzeugt.

**Ergebnisse:** 7 Tage nach Laser konnte eine erhöhte Fundusautofluoreszenz pro Laserkoagulation bei den Männchen als Zeichen für eine erhöhte Phagozytose ermittelt werden. Zudem zeigte sich eine deutlichere Gliose (GFAP) und Angiogenese (VEGF-A) bei den Männchen. Für die anti-Iba1-, und anti-P2YR12-Färbung ließ sich eine erhöhte Mikroglia-dichte und Migration im Vergleich zu ungelaserten Tieren erheben, jedoch ohne geschlechtsspezifischen Unterschied. Die weitere Bildgebung in vivo und immunohistochemische Untersuchungen der CNV ex vivo wiesen keine Anzeichen für geschlechtsspezifische Unterschiede in der Pathologie auf. Aufgrund methodischer Limitationen wurden Wiederholungsexperimente mit erneuter anti-Iba1-, anti-GFAP- sowie anti-Vimentin-Färbung innerhalb der Arbeitsgruppe durchgeführt. Männchen zeigten sich hier phänotypisch reaktiver und wiesen ein größeres Zellsoma auf. Ebenfalls wurde eine differente Expression von GFAP gefunden, die mit einer gesteigerten Gliose bei Weibchen zum Zellschutz in Verbindung steht.

**Schlussfolgerung:** Zusammenfassend konnten geschlechtsspezifische morphologische und funktionelle Unterschiede in Mikroglia bestätigt werden. Die Ergebnisse spornen dazu an, die Immunantwort und Neuroinflammation der CNV bzw. exsudativen AMD genauer zu erforschen.

## 5 Abstract: Englisch

**Background:** The aim of this study was to investigate a sex-specific response of immune cells, in particular micro- and macroglia, in the animal model of laser-induced choroidal neovascularization (CNV). Microglia show sex-specific differences in morphology and function physiologically and in major neurodegenerative diseases. In addition, the pathology of CNV was analyzed sex-specifically in vivo and ex vivo.

**Methods:** 8-week-old C57Bl/6J wild-type mice of both sexes were analyzed. Laser-induced CNV was performed using an argon laser with one laser spot per retinal quadrant around the optic nerve head. Pathology was quantified in vivo 7 and 14 days after laser using imaging methods such as OCT, fluorescein angiography, autofluorescence and infrared reflectance in a blinded fashion. 15 days after laser, the microglia density in the retina and choroid, the CNV volume in the choroid and the intensity of VEGF and GFAP as a sign of angiogenesis and Glia cell activity were recorded ex vivo manually and blinded as an arithmetic mean. Immunohistochemical staining was performed on paraffin sections and flat mounts with the following antibodies: Anti-Iba1, anti-P2YR12, anti-GFAP, anti-VEGF, anti-CD 102 and isolectin B4.

**Results:** 7 days after laser, increased fundus autofluorescence per laser coagulation was detected in the males as a sign of increased phagocytosis. In addition, gliosis (GFAP) and angiogenesis (VEGF-A) were more pronounced in the males. For anti-Iba1 and anti-P2YR12 staining, increased microglial density and migration were observed compared to non-lasered animals, but without gender-specific differences. Further imaging in vivo and immunohistochemical analyses of CNV ex vivo showed no evidence of sex-specific differences in pathology. Due to methodological limitations, additional experiments with renewed anti-Iba1, anti-GFAP and anti-vimentin staining were performed within the working group. Males were phenotypically more reactive and had a larger cell soma. A differential expression of GFAP was also found, which is associated with increased gliosis in females for cell protection.

**Conclusion:** In summary, sex-specific morphological and functional differences in microglia were confirmed. The results encourage further research into the immune response and neuroinflammation of CNV and exudative AMD.



## **6 Einleitung**

Die Choroidale Neovaskularisation (CNV) ist definiert als ein Wachstum neuartiger pathologischer Gefäßmembranen unterhalb der Netzhaut. Diese kann bei fast allen Erkrankungen des hinteren Augenpols als Komplikation entstehen, die häufigste Ursache mit bislang nicht vollständig geklärter Pathogenese ist jedoch die exsudative Altersbedingte Makuladegeneration.

### **6.1 Exsudative Altersbedingte Makuladegeneration (AMD)**

Die exsudative Altersbedingte Makuladegeneration (AMD) - entsprechend der späten Form der AMD (s. Kapitel klinische Manifestation) - ist eine komplexe Augenerkrankung und führende Ursache für nicht heilbare Erblindung bei älteren Menschen weltweit (1). Aktuell ist die AMD insgesamt für 6-9% der weltweiten Erblindungsfälle verantwortlich und somit nach Katarakt und Glaukom die dritthäufigste Ursache (2, 3, 4). Die Prävalenz von fortgeschrittener AMD steigt mit zunehmendem Alter, und Schätzungen prognostizieren, dass bis zum Jahr 2040 etwa 288 Millionen Menschen weltweit von dieser Erkrankung betroffen sein werden, wovon allein in der Europäischen Union bis zu 77 Millionen Menschen erwartet werden (2, 5, 6).

#### *6.1.1 Epidemiologie und Kosten für das Gesundheitssystem*

##### **Epidemiologie**

Die AMD tritt vermehrt ab dem 50. Lebensjahr auf, mit einer globalen Prävalenz von durchschnittlich 8,69% (3). Die frühe Form betrifft etwa 8,01% (3,98–15,49%) der Bevölkerung, während die späte AMD mit einer Prävalenz von 0,37% (0,18–0,77%) seltener ist (3). In Europa beträgt die Prävalenz der frühen und intermediären AMD bei Menschen über 60 Jahren 25,3%, während die Prävalenz der späten AMD bei 2,4% liegt (6).

Die jährliche Inzidenz der späten AMD in Europa wurde auf etwa 1,4 pro 1000 Einwohner geschätzt, wobei die Daten aufgrund unterschiedlicher AMD-Klassifikationen und dem Einschlussalter sehr heterogen sind (6).

##### **Kosten für das Gesundheitssystem**

Die Kosten für das Gesundheitssystem im Zusammenhang mit der exsudativen AMD sind vielschichtig und umfassen ophthalmologische und nicht-ophthalmologische Behandlungskosten, wie beispielsweise Rehabilitationsdienste, Sehhilfen, Transportdienste und Produktivitätsverluste am Arbeitsplatz. Eine Studie von Brown et al ergab, dass der jährliche Verlust des Bruttoinlandsprodukts (BIP) aufgrund von neovaskulärer AMD auf 5,396 Milliarden USD geschätzt wurde (7, 8).

Zusätzlich zu den finanziellen Auswirkungen hat die AMD erhebliche Auswirkungen auf die Lebensqualität der Betroffenen. So wurde herausgefunden, dass die frühe AMD im Durchschnitt zu einer 17%igen Beeinträchtigung der Lebensqualität führt. Eine mittelschwere AMD hingegen kann zu einer 40%igen Beeinträchtigung führen, ähnlich der Beeinträchtigung durch schwere Niereninsuffizienz mit Dialysepflicht oder Angina Pectoris. Die exsudative AMD kann zu einer 60%igen Beeinträchtigung führen und wird mit Erkrankungen wie einem akuten Schlaganfall und dessen medizinischen Folgen assoziiert (8).

Die exsudative AMD stellt somit nicht nur eine erhebliche Herausforderung für das Gesundheitswesen dar, sondern hat auch weitreichende sozioökonomische Auswirkungen und beeinflusst maßgeblich die Lebensqualität der Betroffenen.

### *6.1.2 Pathogenese*

Die AMD ist eine degenerative Erkrankung der Makula, welche den Ort des zentralen Sehens mit seinen Photorezeptoren, retinalen Pigmentepithelzellen (RPE), der Bruch'schen Membran und der Choroidea betrifft. Trotz umfangreicher Forschungsbemühungen sind die genauen pathophysiologischen Mechanismen und Abfolgen, die zur Entstehung und Progression der Erkrankung führen, noch nicht vollständig verstanden.

Um die Neovaskularisation als Spätmanifestation zu begreifen, ist die Betrachtung der bisher erforschten Gesamtpathogenese bei dieser komplexen Erkrankung essenziell.

Die AMD zeigt eine signifikante genetische Prädisposition in etwa 70% der Fälle (2). Eine genomweite Assoziationsstudie identifizierte 52 einzelne Nukleotid-Polymorphismen an 34 genetischen Loci, die mit später AMD in Verbindung stehen (9). Als assoziierte Risikoloci sind bisher Komplementfaktor H (CFH) auf Chromosom 1 und ARMS2/HTRA1 auf Chromosom 10 bekannt (1, 2). Umweltfaktoren wie beispielsweise das Rauchen können die genetische Anfälligkeit und die Schwere der AMD mit beeinflussen.

Schlüsselmechanismen in der Pathogenese der AMD sind:

**Bildung von Drusen:** Drusen, Ansammlungen von überwiegend Lipoproteinen, sind ein wichtiger Risikofaktor für schweren Sehverlust. Die Lipoproteine werden aus RPE-Zellen mit gestörtem Cholesterinefflux sezerniert (10, 11). Drusen nehmen im Verlauf der Erkrankung an Größe und Anzahl zu (2).

**Mikroangiopathie:** Der altersabhängige Verlust der Choriokapillaris, der innersten Gefäßschicht der Choroidea, führt zur Photorezeptor- und RPE-Ischämie und damit zur weiteren Dysregulation mit gestörtem Abtransport von Lipoproteinen (2, 12, 13, 14)

**Ablösung von RPE-Zellen und Migration:** Das retinale Pigmentepithel spielt eine entscheidende Rolle in der Erhaltung der Netzhautgesundheit durch seinen Abtransport von Lipoproteinen und Phagozytose von alten Photorezeptorsegmenten. Gestörte RPE-Zellen lösen sich, migrieren in die Netzhaut und führen zu Pigmentepithelverklumpungen (2).

**Veränderungen in der Bruch'schen Membran:** In der Bruch'sche Membran, der Grenzmembran zwischen Choriokapillaris und retinalem Pigmentepithel, bilden sich basale laminare Ablagerungen von cholesterolreichen Lipoproteinen. Dies führt zu Inflammationskaskaden (2, 10, 11, 15).

**Oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktion:** Aufgrund des hohen Sauerstoffverbrauchs der Retina und ihrer Exposition gegenüber Licht entstehen reaktive Sauerstoffspezies, die oxidativen Stress verursachen. Zusätzlich ist eine Dysfunktion der Mitochondrien zu beobachten, welche zur reduzierten RPE-Kapazität beiträgt (2, 16).

**Dysfunktionale Extrazelluläre Matrix und Inflammation:** Eine gestörte extrazelluläre Matrix aufgrund dysregulierter spezifischer Matrix-Metalloproteasen (MMP) und ihrer Inhibitoren (TIMPS) hat eine Schlüsselfunktion in der Entstehung und dem Fortschreiten der AMD (17). Seneszente Zellen setzen präinflammatorische Zytokine und Chemokine frei und stimulieren das Gewebekomplementsystem (18). Es entsteht eine lokalisierte Immunaktivierung mit subretinaler bzw. choroidaler Rekrutierung von Mikroglia und Makrophagen (19, 20, 21)

**Degeneration von Photorezeptorzellen:** Der Verlust kritischer Funktionen des RPE führt zur Neurodegeneration mit Apoptose und Nekrose von Photorezeptoren (2).

**Neovaskularisation:** Eine makuläre Neovaskularisation (MNV) bildet sich, um die Degeneration zu verlangsamen und die Diffusionstrecke von Sauerstoff und Nährstoffen zu verkürzen (22). Der Übergangsmechanismus in die neovaskuläre AMD ist noch nicht geklärt, nach jetzigem Stand der Wissenschaft tragen eine Modulation der Komplementfunktion, Stimulation durch Mikroglia, Veränderungen von Perizyten sowie Veränderungen im Gleichgewicht von angiogenen Wachstumsfaktoren wie vascular endothelial growth factor (VEGF) und placental growth factor (PEGF) bei (2, 22, 23, 24, 25, 26). Es entsteht eine fibrovaskuläre Gefäßmembran, welche bei der choroidalen Neovaskularisation aus der Choriokapillaris durch die Bruch'sche Membran in den subretinalen Raum wächst.

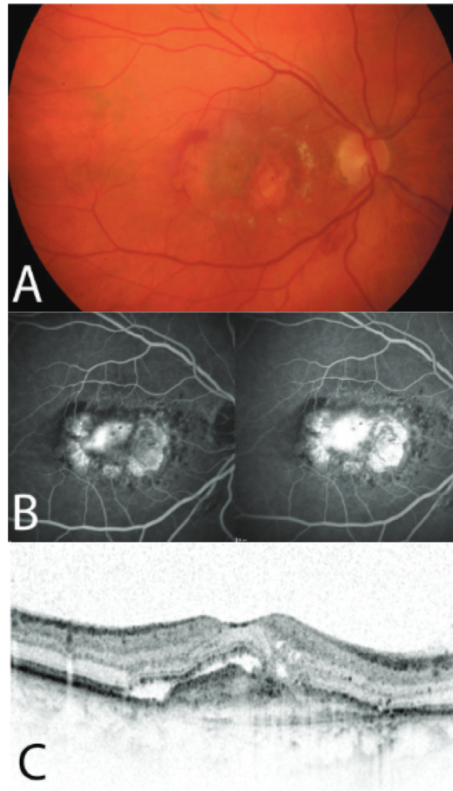
### 6.1.3 *Klinische Manifestation*

Die AMD ist eine Augenerkrankung, die sich in zwei Hauptformen einteilt: Die trockene AMD, die etwa 80-90% der Fälle ausmacht, und die exsudative AMD (10-20%) (1).

Die exsudative Form ist, nach klinischer Klassifikation gemäß Beckman Initiative for Macular Research Classification Committee, die Spätform der AMD (2, 27). Zur Spätphase gehört zum einen die geographische Atrophie, die den Verlust von Photorezeptoren, RPE-Zellen und Choriokapillaris charakterisiert. Zum anderen beinhaltet dies die Neovaskularisation in die äußere Retina, den subretinalen oder sub-RPE-Raum (28).

Klinisch ist die neovaskuläre und exsudative AMD mit folgenden Merkmalen vergesellschaftet (4):

- a) **Subretinale Flüssigkeit (SRF):** Flüssigkeitsansammlung unter der Netzhaut
- b) **Intraretinale Flüssigkeit (IRF):** Flüssigkeitsansammlung im Bereich der Netzhaut
- c) **subretinale oder sub-RPE-Blutung:** Blutungen unter der Netzhaut oder unter dem retinalen Pigmentepithel
- d) **Lipid-Exsudate**
- e) **RPE-Abhebung:** Ablösung des retinalen Pigmentepithels mit seröser oder hämorrhagischen Flüssigkeitsansammlung
- f) **Fibrose, Atrophie oder einer disciformen Narbe** im Endstadium



**Abbildung 1.** CNV bei exsudativer AMD.

**A** zeigt eine Fundusfotografie mit Blutungen und fibrovaskulärem Gewebe, in **B** sind mittels Fluoreszeinangiographie Leckagen aus Neovaskularisationen unterhalb (okkulte CNV) und oberhalb des RPE (klassische CNV) erkennbar. **C** zeigt im OCT subretinale Flüssigkeit, eine Abhebung des RPE, subretinale hyperreflektive Ablagerungen sowie intraretinale Zysten im Bereich der Makula. Quelle: entnommen aus (29).

Zur Diagnosesicherung der Neovaskularisationen dient die Fluoreszenzangiographie sowie Optische Kohärenztomographie (OCT), in denen der Ort der Gefäßmembranen ober- und unterhalb des RPE unterschieden werden kann (30, 31) .

**Tabelle 1.** Internationale Klassifikation der makulären Neovaskularisation(2, 32)

<i>TYP</i>	<i>OCT</i>	<i>FAG</i>
MNV I	Pigmentepithelabhebung, Neovaskularisation von Choriokapillaris ausgehend bis unterhalb des RPE	Okkulte CNV

MNV II	Neovaskularisation von Choriokapillaris ausgehend bis oberhalb des RPE	Klassische CNV
MNV III	Retinale angiomatöse Proliferation, Neovaskularisation vom tiefen retinalen Kapillarplexus Richtung Choroidea	Mischbild

#### 6.1.4 Zusammenhang zwischen Geschlecht und Erkrankung

In den letzten Jahren hat sich ein wachsendes Interesse an geschlechtsspezifischen Unterschieden in Bezug auf die Prävalenz und den Verlauf der AMD entwickelt. Im Folgenden ist ein Überblick über verschiedene Studien dargestellt.

Bezüglich der Prävalenz zeigen Untersuchungen, dass Frauen mit etwa 60% im Allgemeinen häufiger von der AMD betroffen sind als Männer. Dieser Unterschied wurde in verschiedenen Studien dokumentiert (33, 34, 35, 36). Es wird vermutet, dass die längere Lebenserwartung von Frauen hierbei eine Rolle spielt (37, 38, 39). Eine weitere geschlechtsspezifische Beobachtung ist, dass Frauen tendenziell länger auf Augenoperationen warten als Männer (40). Erblindung oder Sehbehinderung aufgrund einer AMD kann zu psychischen Beeinträchtigungen führen, wie Angststörungen und Depressionen. Im Review von Aninye et al. wurde gezeigt, dass diese psychischen Probleme bei Frauen häufiger auftreten (38). Die Age-Related-Eye Disease Study 2000 (AREDS) des National Institute of Health in den USA untersuchte Risikofaktoren für die AMD und fand heraus, dass bestimmte Merkmale, wie intermediäre Drusen und Pigmentanomalien, bei Frauen mit höherer Wahrscheinlichkeit auftreten (35, 40). Außerdem wiesen in einige Studien Frauen größere Progressionsraten auf (39, 41, 42, 43, 44). Eine randomisiert klinische Studie aus Dänemark aus dem Jahr 2018 untersuchte die Auswirkungen der VEGF-Hemmung auf die exsudative AMD und fand heraus, dass das männliche Geschlecht eine geringere Reduktion der zentralen Netzhautdicke (CRT) aufwies (45). Zudem identifizierte eine retrospektive klinische Studie aus Portugal als prädiktiven Faktor für den Visus bei neovaskulärer AMD das weibliche Geschlecht und ein jüngeres Alter (46).

Obwohl die oben genannten Studien geschlechtsspezifische Unterschiede in der AMD gefunden haben, sind die Ergebnisse inkonsistent. In einigen Untersuchungen wie der Beaver Dam Eye Studie, Blue Mountains Eye Studie, Tromso Eye Studie und Meta-Analysen von Colijn et al. wurde

kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und der Prävalenz der Erkrankung oder ihrem Verlauf festgestellt (5, 47, 48, 49, 50, 51).

Mögliche Ursachen für geschlechtsspezifische Unterschiede werden aktuell auf verschiedene genetische, immunologische und systemische Faktoren zurückgeführt (44, 52, 53, 54, 55, 56). Dazu gehören unterschiedliche Zusammensetzungen von Chemokinen und Aktivierungen des Immunsystems (57, 58, 59). Die Rolle von Hormonen wie Östrogenen und X-gebundenen Genen wird ebenfalls diskutiert (60, 61).

Die geschlechtsspezifische Forschung hat bereits Unterschiede in den verschiedensten Organsystemen wie dem zentralen Nervensystem, Gastrointestinaltrakt, den Nieren, dem kardiovaskulären System, dem endokrinen System und dem Immunsystem aufgezeigt.

Weitere bekannte Augenerkrankungen mit nachgewiesener geschlechtsabhängiger Prävalenz sind beispielsweise das Sicca-Syndrom und die Endokrine Orbitopathie (38).

Bei ZNS-Erkrankungen sind Frauen häufiger von autoimmunen Erkrankungen betroffen, darunter Multiple Sklerose, Neuromyelitis Optika Spektrum-Erkrankungen und Autoimmune Enzephalitis (62). Darüber hinaus sind Frauen anfälliger für Morbus Alzheimer und Depression, während Männer eher an Parkinson, Early-onset Schizophrenie und Autismus erkranken (63, 64).

Anhand von Studien des Immunsystems wurde herausgefunden, dass erwachsene Frauen eine stärkere erworbene und adaptive Immunantwort aufweisen, was die Empfänglichkeit für Autoimmun- und entzündliche Erkrankungen erhöht (65).

Alles in allem sind geschlechtsspezifische Unterschiede komplex und erfordern weitere Forschung, um die genauen Ursachen und Auswirkungen zu verstehen. Die längere Lebenserwartung von Frauen, genetische Faktoren und immunologische Unterschiede könnten alle eine Rolle spielen. Die Identifizierung dieser kann dazu beitragen, die Prävention und Behandlung von AMD zu verbessern und sicherzustellen, dass beide Geschlechter angemessen versorgt werden.

## **6.2 Immunzellen der Retina**

Zur Aufrechterhaltung ihrer Funktion und zum Schutz vor Krankheiten verfügt die Retina über ein effizientes Immunsystem, das von verschiedenen Immunzellen unterstützt wird.

In bestimmten Augenerkrankungen wie der AMD ist das Gleichgewicht des Immunsystems gestört, was zu Entzündungen und Gewebeschädigungen führt. Die Erforschung der Immunzellen in der Retina und ihrer Rolle bei solchen Erkrankungen ist von großer Bedeutung, um neue Ansätze für die Behandlung und Prävention zu entwickeln.

### 6.2.1 *Mikroglia und Makroglia*

Zu den Immunzellen, die zur Aufrechterhaltung der Gewebemöostase und zur Immunabwehr beitragen, gehören Mikroglia und Makroglia.

#### **Mikroglia:**

Die Mikroglia sind residente Immunzellen des zentralen Nervensystems (ZNS) und der Retina (66). Entdeckt wurden sie etwa im Jahr 1920 von dem spanischen Mediziner und Histologen Pio del Rio-Hortega, dem bis dahin nur Neuronen und Astrozyten im ZNS bekannt waren (67). Der genaue Ursprung ist noch nicht vollständig geklärt, nach aktuellem Forschungsstand entstehen sie aus erythro-myeloiden Vorläuferzellen aus dem embryonalen Dottersack (68, 69). Die Mikroglia erreichen die Retina etwa ab der 10. Schwangerschaftswoche über bereits ausgebildete Blutgefäße von Iris und Ziliarkörper sowie über das vitreoretinale Interface. Eine zweite Einwanderungsphase erfolgt nach der Geburt mit der Vaskularisierung der Retina (67, 69).

Die Mikroglia spielen eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung des ZNS und der Retina sowie bei der Homöostase und Immunabwehr (66, 68, 69). Unter physiologischen Bedingungen sind sie hauptsächlich in der inneren Retina lokalisiert, bestehend aus Ganglienzellschicht (GCL), innerer und äußerer plexiformer Schicht (IPL und OPL) sowie innerer Körnerschicht (INL). Bei Immunreaktionen und Pathologien migrieren sie in die äußeren Retinaschichten, einschließlich der äußeren Körnerschicht (ONL), der retinalen Pigmentepithelschicht (RPE) und dem subretinalen Raum (68).

Mikroglia überwachen kontinuierlich ihre Umgebung und reagieren rasch auf physiologische und pathologische Veränderungen durch Polarisierung und Migration (68). Sie exprimieren eine Vielzahl von Rezeptoren, Zytokinen, Chemokinen, aber auch toxischen Faktoren, wodurch sie sowohl zytotoxische als auch zytoprotektive Effekte ausüben können. Ihre Immunfunktionen umfassen Phagozytose, Komplementaktivierung, Antigenpräsentation und die Ausschüttung entzündlicher Zytokine (68).

Wurden Mikroglia in früheren Studien dichotom bezüglich Funktion und Morphologie eingeteilt (M1- und M2-Polarisation als pro-inflammatorisch bzw anti-inflammatorisch ; ramifiziert versus amöboid) , ermöglicht die aktuelle Integration von epigenetischen, transkriptomischen, metabolischen und proteomischen Daten eine multidimensionale Sichtweise, die coexistierende Zustände mit verschiedenen Morphologieformen der Mikroglia offenbart (70).

In der retinalen Angiogenese unterstützen Mikroglia nach der Geburt das Wachstum, die Verzweigung und die Inhibition weiterer Blutgefäße durch die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie



Transforming Growth Factor (TGF), Angiopoietin, Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (69).

### **Makroglia:**

Makroglia in der Retina bestehen aus zwei Haupttypen: Astroglia und Müllerzellen (71). Sie erfüllen wichtige Funktionen bei der Ernährung von Photorezeptoren und Neuronen sowie bei der Aufrechterhaltung der metabolischen Homöostase und der Blut-Retina-Schranke (71).

Astroglia sind in der Ganglienzellschicht und der retinalen Nervenfaserschicht präsent. Sie lassen sich in drei Untergruppen einteilen: Bipolare Astrozyten, die zwischen Nervenfaserbündeln verlaufen, perivaskuläre Astrozyten, die sich um Blutgefäße befinden, und stellate Astrozyten (71). Ihre Hauptaufgaben umfassen die Aufrechterhaltung der metabolischen Homöostase und der Blut-Retina-Schranke. Außerdem sind sie als Reaktion auf Verletzungen für die Gliose verantwortlich, eine Aktivierungs-, Proliferations- und Migrationsreaktion mit erhöhter Expression von Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) und Ausschüttung von neurotrophen Faktoren (71).

Müllerzellen sind spezialisierte Gliazellen, deren Zellkörper in der inneren Körnerschicht liegen und die sich zwischen der inneren und äußeren Grenzmembran erstrecken (71). Sie sind für die Regulation des extrazellulären Volumens, des pH-Werts sowie des Ionen- und Wasserhaushalts verantwortlich (71). Müllerzellen sind auch wichtig für die Aufrechterhaltung der Blut-Retina-Schranke und spielen eine essenzielle Rolle bei der Re-Synthese von Neurotransmittern wie GABA und Glutamat mittels Gluthaminsynthase (71).

In der Fovea, dem Bereich der schärfsten Sehschärfe in der Retina, sind Müllerzellen die einzigen Gliazellen. Sie verbessern die Lichttransmission zu den Zapfen durch eine besondere Anordnung von Filamenten als Nanooptische Kanäle und eine Veränderung der Brechkraft des Zytoplasmas (71).

#### *6.2.2 Bedeutung bei der Altersbedingten Makuladegeneration*

Bei der AMD kommt es unter anderem zu einer Störung in der angeborenen Immunabwehr, welche zu einer chronischen Aktivierung des Komplementsystems, von perivaskulären Makrophagen und Mikroglia führt (66).

Mikroglia weichen von ihrer physiologischen Rolle als schützende Immunzellen ab und zeigen stattdessen eine persistierende chronische Aktivierung und schädliche Entzündungsreaktion (67). Dies steht im Gegensatz zu altersbedingten Immunmechanismen, die durch oxidativen Stress verursacht werden und eine mildere Aktivierung von Mikroglia und Makrophagen hervorrufen(67).

Die Bildung von Ablagerungen und Drusen in der Netzhaut führt zur Aktivierung von perivaskulären Makrophagen und Mikroglia. Sie wandern an den Ort der Neurodegeneration, insbesondere bei der neovaskulären AMD, und phagozytieren Photorezeptor-Debris. Dies kann jedoch weitere Schäden verursachen, da sie zytotoxische Zytokine freisetzen (66, 67, 68).

Eine gestörte Regulation des CX3CR1/CX3CL1-Signalwegs, der normalerweise die Homöostase zwischen Mikroglia, Neuronen und Endothelzellen aufrechterhält, trägt ebenfalls zur AMD-Pathogenese bei (66, 68). In der Studie von Iannaccone et al aus 2017 wurde herausgefunden, dass Mikroglia und RPE-Zellen den Scavenger Rezeptor CD5L exprimieren, der möglicherweise zur Bildung von Autoantikörpern gegen CD5L beiträgt und so die Immunregulation stört (72).

Auch die Dysregulation der Komplementkaskade führt zu einem autologem Schaden und fördert die fortschreitende Bildung von Drusen. In diesem Zusammenhang wurden proinflammatorische Mikroglia identifiziert, die Komplementfaktoren wie C3 exprimieren und so zu strukturellen Veränderungen bis zur Atrophie beitragen (68).

Die Umwandlung zur chronischen Polarisierung von Mikroglia, begleitet von der Expression von Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , führt zur gestörten Blut-Retina-Schranke, Ödemen und weiterer Entzündung (68). Diese proinflammatorische Mikroglia tragen auch zur Angiogenese bei, indem sie proangiogene Faktoren wie VEGF-A exprimieren (68).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Immunzellen, v.a. Mikroglia, eine erhebliche Rolle in der Pathogenese der AMD spielen, indem sie Schäden an Photorezeptoren und RPE-Zellen verursachen, den Komplementweg aktivieren, proinflammatorische Zytokine und proangiogene Faktoren freisetzen, die zur Neovaskularisation beitragen.

### *6.2.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede*

Neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer-Demenz, Parkinson und Multiple Sklerose, in denen Mikroglia mittels Neuroinflammation und gestörter Homöostase eine Rolle spielen, sind in ihrer Prävalenz und Progression geschlechtsspezifisch geprägt. Trotz dieser Erkenntnisse ist das genaue Ausmaß und die Mechanismen, wie Mikroglia zu diesen geschlechtsspezifischen Unterschieden beitragen, noch weitgehend unverstanden.

Tierexperimentelle Studien zur Alzheimer-Demenz konnten beispielsweise bisher zeigen, dass weibliche Mikroglia eine reduziertere Phagozytose der Amyloid- $\beta$ -Plaques aufweisen, was als mögliche Ursache für die erhöhte weibliche Prävalenz in dieser Erkrankung dienen könnte (73, 74, 75). In einem Mausmodell für eine Autismus-Spektrum-Störung konnte von Guneykaya et al

nachgewiesen werden, das männliche Mikroglia eine geringere Dichte und eine reduziertere Immunantwort haben (76). In einem tierexperimentellen Modell für Parkinson wiesen Männchen eine vermehrte Mikrogliose und Astrogliose auf (77). Bei der neuropathischen Schmerzübermittlung spielen Mikroglia auch eine geschlechtsspezifische Rolle, da nur bei männlichen Zellen P2XR-Rezeptoren aktiviert werden (78). Diese Erkenntnisse unterstreichen die Bedeutung der Berücksichtigung des Geschlechts in der Forschung und Entwicklung von Therapien für neurodegenerative Erkrankungen.

Im Gehirn gibt es ferner Hinweise darauf, dass es geschlechtsspezifische Unterschiede in der Morphologie, Dichte und im Transkriptionsprofil von Mikroglia gibt (79). Männliche Mikroglia weisen ein größeres Zellsoma, eine höhere Migrationskapazität und vermehrte Expression von Entzündungsmediatoren auf (76, 79). Im Gegensatz dazu zeigen weibliche Mikroglia eine vermehrte anti-inflammatorische Expression zum Schutz von Zellen (79).

Eine Studie von Villa et al. im Jahre 2018 konnte signifikante Unterschiede im Transkriptom von männlichen und weiblichen Mikroglia im Mausmodell nachweisen. Sie vermuten, dass diese Unterschiede auf perinatale Prägung durch Sexualhormone zurückzuführen sind, denn erwachsene Mikroglia behielten ihre Funktionen unabhängig von Hormoneinflüssen bei (80).

Männliche Mikroglia zeigen eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, der zur Regulation der Immunantwort und zur Produktion von Zytokinen dient (78). Weibliche Mikroglia passen ihr Transkriptom im Erwachsenenalter nach akuten oder chronischen Infektionen an, was auf eine gewisse Anpassungsfähigkeit hinweist (78). Diese geschlechtsspezifischen Unterschiede werden auch durch X-Inaktivierung beeinflusst, wobei einige Gene diesem Mechanismus entkommen und intrinsische Transkriptionsunterschiede zwischen weiblichen und männlichen Mikroglia erzeugen (73).

Geschlechtsspezifische Unterschiede erstrecken sich jedoch nicht nur auf Mikroglia, sondern auch auf Neuronen und Astrozyten in Bezug auf ihre Verteilung, Differenzierung, Anzahl, Funktion und Morphologie(78). Neuronen haben regional unterschiedliche Volumen, Fortsätze und ebenfalls eine geschlechtsspezifische Gentranskription (78). Während der humanen Embryogenese synthetisiertes Testosteron aus den Hoden und bei Mäusen perinatal synthetisiertes Testosteron spielen eine Rolle bei der Maskulinisierung bestimmter Gehirnmechanismen (78).

Die genauen Mechanismen für die geschlechtsspezifische inflammatorische Antwort der Mikroglia sind noch nicht vollständig verstanden. Es besteht weiterer Forschungsbedarf in Bezug auf die

übergeordneten Regulationsmechanismen, einschließlich der gonadalen Achse, der hormonellen Achse und der interzellulären Kommunikation.

### **6.3 Tiermodelle zur Untersuchung der exsudativen AMD**

Die exsudative Form der AMD wird hauptsächlich durch CNV charakterisiert und präsentiert sich als eine wachsende Herausforderung aufgrund der zunehmenden Anzahl betroffener Patienten. Die Notwendigkeit einer effektiven Therapie bei anhaltend hohen Therapiekosten und Krankheitslast erfordert die kontinuierliche Suche nach neuen Therapieansätzen und Behandlungsalternativen. In diesem Zusammenhang spielen experimentelle Tiermodelle eine entscheidende Rolle, da sie nicht nur die Evaluierung von potenziellen Wirkstoffen ermöglichen, sondern auch Einblicke in die Pathogenese der CNV gewähren.

Es existieren drei übergeordnete Tiermodelle, die zur Untersuchung relevant sind:

**Laserinduziertes CNV-Modell:** Dieses Modell nutzt einen Laser, um gezielt Läsionen in der Bruch-Membran zu erzeugen und somit eine CNV zu induzieren. Es bietet den Vorteil der reproduzierbaren Läsionen und ermöglicht die genaue Kontrolle über die Induktionsparameter. Dieses Modell ist kosteneffektiv und weit verbreitet (81).

**Chirurgisch induziertes CNV-Modell:** In diesem Modell werden subretinale Injektionen zur Stimulation der CNV durchgeführt. Dies stellt eine technische Herausforderung vor allem bei Mäusen dar. Das Modell ermöglicht die Untersuchung der CNV unter Bedingungen, die den natürlichen Verlauf der Erkrankung nachahmen (81).

**Genetisch modifiziertes Modell:** Die Schaffung von genetisch modifizierten Tieren, die anfällig für die Entwicklung von CNV sind, ermöglicht eine detaillierte Analyse der zugrunde liegenden genetischen Mechanismen. Obwohl dieses Modell höhere Kosten für die Erzeugung und Pflege genetisch veränderter Tiere mit sich bringt und Zeit bis zum Eintritt der CNV benötigt, bietet es Einblicke in die molekularen Grundlagen der CNV (81).

Die Auswahl des geeigneten Tiermodells für die Untersuchung der exsudativen AMD erfordert eine sorgfältige Abwägung der Ähnlichkeit zur humanen CNV, der Erschwinglichkeit sowie der Rechtfertigung der experimentellen Verwendung.

#### *6.3.1 Laser-induzierte Choroidale Neovaskularisation (CNV)*

Die laserinduzierte CNV ist ein etabliertes Modell, das erstmals 1979 von Ryan et al. an Rhesusaffen durchgeführt wurde (82). Hierbei wurde ein Argon-Laser hoher Energie (200-900 mW Leistung, 0,1 Sekunden Dauer, 50-100 µm Größe) eingesetzt, was in 80% der Fälle zur Bildung von

CNV führte (82). Angewendet wurde dieses Modell später auch an Ratten (1989) und Hasen (1991), wobei unterschiedliche Lasermethoden verwendet wurden, einschließlich subretinaler Bestrahlung (83, 84).

Das laserinduzierte CNV-Mausmodell wurde schließlich 1998 entwickelt, wobei ein Krypton-Laser (350-400 mW Leistung, 50 µm Spotgröße, 0,05 Sekunden Dauer) verwendet wurden (85). Ein charakteristisches Zeichen für eine erfolgreiche CNV-Initiierung war das Auftreten einer zentralen Blase während des Laserns. Etwa 60% der Fälle zeigten bereits innerhalb einer Woche nach dem Eingriff durch Fluoreszeinangiographie (FAG) eine CNV, wobei dieser Nachweis in der zweiten Woche auf 90% anstieg (85). Zusätzlich konnte histopathologisch in 80% der Fälle eine CNV bestätigt werden, wobei nach einer Woche eine Neovaskularisation aus der Choroidea in den subretinalen Raum nachgewiesen wurde (85).

Das Modell basiert auf dem Prinzip der Wundheilung und ist daher selbstlimitierend. Es zeichnet sich durch seine einfache Anwendung, Reproduzierbarkeit und die kurze Zeitspanne bis zum Nachweis der CNV aus. Trotz häufiger Anwendung in der Forschung, insbesondere bei Mäusen (76% Verwendung), weist eine Studie von Fabian-Jessing et al. darauf hin, dass bisher hauptsächlich männliche Mäuse verwendet wurden und die Dokumentation der Lasereinstellungen in Studien unzureichend ist (86). Diese Mängel beeinträchtigen die klinische Translation und Reproduzierbarkeit (86).

### *6.3.2 Tierexperimente und Geschlechtsspezifität*

Seit 2015 hat das National Institute of Health (NIH) die neue Richtlinie eingeführt, welche die Berücksichtigung des Geschlechts als biologische Variable in präklinischen Studien vorschreibt (65). Dieser Ansatz zielt darauf ab, die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu verbessern. In einer Meta-Analyse betonten Fabian-Jessing et al im Jahr 2022 die bisher unzureichende Untersuchung der Geschlechtsspezifität in laserinduzierten CNV-Experimenten. Bei 44% der Experimente wurden ausschließlich männliche Mäuse eingeschlossen und bei 32% war die geschlechtsspezifische Verteilung nicht bekannt (86).

An bisherigen geschlechtsspezifischen Studien zu AMD-Modellen untersuchten Espinosa-Heidmann et. al 2005 den Einfluss von Östrogenen auf laserinduzierte CNV. Dabei zeigten 16 Monate alte weibliche Mäuse eine signifikant größere CNV im Vergleich zu männlichen Mäusen (87). Östrogensubstitution verstärkte diesen Effekt durch vermutete pro-inflammatorische Wirkungen (87). Hope et al analysierten 1992 isolierte Kolonien von Rhesusaffen und fanden heraus, dass Weibchen unabhängig vom Lebensalter eine fast doppelt so hohe Prävalenz an Drusen aufwiesen

wie Männchen (88). In einem Mausmodell zur systemischen Inflammation und laserinduzierten CNV wurde gezeigt, dass bei systemischer Inflammation die Größe der CNV am Auge reduziert ist, wobei Männchen im Vergleich zu Weibchen eine kleinere CNV aufwiesen (89). Dies könnte auf eine vermehrte Expression vom angiostatischen Faktor Cxcl9 bzw. IFN $\gamma$  zurückzuführen sein, der möglicherweise durch Testosteron reguliert wird (89). Bei der Untersuchung von oxidativem Stress mit NaIO $_3$ -induziertem RPE- und Photorezeptorschaden als trockenes AMD-Modell wurde eine erhöhte Sensitivität bei Weibchen im Vergleich zu Männchen festgestellt (90).

Die vorgestellten Ergebnisse unterstreichen die Relevanz der Geschlechtsspezifität in Tiermodellen für laserinduzierte CNV und AMD. Eine differenzierte Betrachtung ist notwendig, um die Auswirkungen von Geschlechtsunterschieden auf die untersuchten Parameter zu verstehen und die Übertragbarkeit auf menschliche Verhältnisse zu verbessern.

#### **6.4 Zielsetzung der Arbeit**

Die aktuelle Studienlage zur AMD weist bisher inkonsistente geschlechtsspezifische Unterschiede im klinischen Verlauf auf. Gleichzeitig ist die Beteiligung von Mikroglia und Inflammation im Krankheitsgeschehen noch nicht vollständig geklärt. Mikroglia, als regulierende Akteure im neuroinflammatorischen Prozess, zeigen geschlechtsspezifische Unterschiede in Morphologie und Funktion. Diese Unterschiede sind in bedeutenden neurologischen Erkrankungen mit Beteiligung von Mikroglia bereits nachweisbar.

Tiermodelle erweisen sich als wertvoll, um die molekularen Mechanismen hinter geschlechtsspezifischen Unterschieden in der AMD und insbesondere in der Pathologie der laserinduzierten Choroidalen Neovaskularisation (CNV) zu erkennen. Hier sind bisher vereinzelte Unterschiede dokumentiert. Weitere Erkenntnisse könnten einen bedeutenden Beitrag zur Präzisionsmedizin leisten, indem sie anstelle von "Ein-Medikament-für-alle"-Modellen den Schlüssel zur Behandlung des AMD-Krankheitsspektrums in der Zukunft bieten.

Das Hauptziel dieser Doktorarbeit ist es, ein besseres Verständnis dafür zu entwickeln, was Geschlechtsspezifität im Pathomechanismus der laserinduzierten CNV bedeutet und wie sie definiert werden kann. Die Forschungsfrage fokussiert sich darauf, ob es eine geschlechtsspezifische Antwort bei Mikrogliazellen in der laserinduzierten CNV gibt. Durch den tierexperimentellen Einsatz von Grundlagenmethoden wird angestrebt, eine Antwort auf die bisher inkonsistente Studienlage zu liefern und somit einen Beitrag zur Weiterentwicklung therapeutischer Ansätze für die AMD zu leisten.

## 7 Material und Methodik

### 7.1 Materialien

#### 7.1.1 Verwendete Mäuse

C57Bl/6J-Wildtyp-Mäuse beider Geschlechter wurden verwendet, mit einem Anteil Weibchen zu Männchen 57%: 43%. Sie stammten aus der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin der Charité Universitätsmedizin Berlin und alle Experimente sind vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin unter den Registrierungsnummern G 0235/15 und G 0036/16 genehmigt worden. Alle Tiere waren 8 Wochen alt und wogen um die 20g zum Zeitpunkt der Laserkoagulation. In den Ställen wurde für jeweils 12 Stunden ein Licht-Dunkel-Zyklus eingehalten und die Mäuse wurden mit Nahrung und Wasser ad libitum versorgt. Um das Tierwohl bestmöglich zu gewährleisten, entsprach die Durchführung der Experimente zu jeder Zeit den Richtlinien der ARVO (Statements for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research) und den Richtlinien des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin. Dabei wurden die Tiere randomisiert den verschiedenen Untersuchungsgruppen zugeteilt.

#### 7.1.2 Anästhesie und Augenmedikation

**Tabelle 2.** Medikation

<i><b>NAME</b></i>	<i><b>HERSTELLER</b></i>
Phenylephrin-Tropicamid Tropfen	Charité Apotheke, Berlin, Germany
Ketamin Lösung	Actavis, München, Germany
Xylazin Lösung	Rompun, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Germany
Methocel 2% Tropfen	OmniVision, Wien, Austria
Corneregel Augengel	Bausch & Lomb GmbH, Berlin, Germany
Hylo-Vision Tropfen	OmniVision, Puchheimn, Germany
Fluorescein 10% Lösung	Alcon, Freiburg, Germany

#### 7.1.3 Verwendete Antikörper

**Tabelle 3.** Antikörper

<i><b>NAME</b></i>	<i><b>TYP</b></i>	<i><b>HERSTELLER</b></i>
Anti-GFAP, Guinea Pig Polyclonal IGG, 173 004	Primär	Synaptic Systems, Göttingen, Germany
Anti-VEGF-A, Rabbit Polyclonal IGG, PA1080	Primär	Boster Biological Technology, Pleasanton, CA, USA
Anti-Iba1, Goat Polyclonal IGG, Ab5076	Primär	Abcam, Cambridge, UK

Anti-P2Y12, Rabbit Polyclonal IGG, Hpa014518	Primär	Atlas Antibodies, Bromma, Sweden
GS Isolectin-IB <sub>4</sub> , Alexa Fluor® 647- Konjugat, I32450	Primär	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GS Isolectin-IB <sub>4</sub> , Alexa Fluor® 488- Konjugat, L21411	Primär	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Anti-CD102, Rat Monoclonal Igg, 553325	Primär	BD Pharmingen, San Diego, CA, United States
Alexa Fluor® 488, Donkey Anti-Goat, 705-545-147	Sekundär	Dianova, Hamburg, Germany
Cy3, Donkey Anti-Rabbit, 711-165-152	Sekundär	Dianova, Hamburg, Germany
Alexa Fluor® 408, Goat Anti-Rat, Ab175671	Sekundär	Abcam, Cambridge, UK
Alexa Fluor® 649, Donkey Anti-Guinea Pig, 706-605-148	Sekundär	Dianova, Hamburg, Germany
Alexa Fluor® 488, Donkey Anti-Rabbit, 711-545-152	Sekundär	Dianova, Hamburg, Germany

#### 7.1.4 Chemikalien, Puffer und Lösungen

**Tabelle 4.** Chemikalien, Puffer und Lösungen

<b>CHEMIKALIEN</b>	<b>HERSTELLER</b>	<b>PUFFER UND LÖSUNGEN</b>	<b>BESTANDTEILE</b>	<b>MENGE UND KONZENTRATION</b>
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	Antikörperlösung I	BSA in TBS	0,8 %
		Antikörperlösung II	Donkey Serum in TBS	10%
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	Blocking-Lösung I	BSA in TBS	5%
Donkey Serum	Abcam, Cambridge, UK	Fixierlösung I	PFA in TBS	4%



Tween ®-20	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA	Permeabilisati- onsmittel I	Triton-X-100 in TBS	0,5 %
Citratpuffer	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA	Permeabilisati- onsmittel + Blo- cking-Lösung II	Triton-X-100 Donkey Serum BSA in TBS	1% 5% 5%
Barrier Pen	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark	TBS	TrisSäure TrisBase Natriumchlorid in destilliertem Wasser	24g 5,6g 88g 900 ml
DAPI	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mis- souri, USA	DPBS	Kaliumchlorid Kaliumhydro- genphosphat Natriumchlorid Natriumhydro- genphosphat in destilliertem Wasser	0,2 g 0,2g 8g 2,2g 500ml
Xylol	Carl Roth, Karls- ruhe, Deutsch- land			
Ethanol	J.T.Baker, Cen- ter Valley, USA			
Isopropanol	Carl Roth, Karls- ruhe, Deutsch- land			
Methanol	Carl Roth, Karls- ruhe, Deutsch- land			
Fluorescent Mounting Me- dium	Dako North America, Inc., Carpinteria, Cal- ifornia, USA			
DPBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mis- souri, USA			

### 7.1.5 Geräte

**Tabelle 5.** Geräte

<i>NAME</i>	<i>HERSTELLER</i>
Spectralis HRA+OCT	Heidelberg Engineering, Heidelberg, Deutsch- land

Visulas 532 S Argonlaser	Carl Zeiss Meditec, Oberkochen, Germany
Axio Imager M2	Zeiss, Jena, Deutschland
Leica TCS SPE	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

### 7.1.6 Software

**Tabelle 6.** Verwendete Software

<i>NAME</i>	<i>HERSTELLER</i>
(Fiji Is Just) ImageJ Software 2.0.0-Rc-69/1.53m	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Heidelberg Eye Explorer 1.7.0.0	Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Deutschland
Microsoft Office Version 16.29	Microsoft, Redmond, Washington, USA
ZEN Lite 2012 Software	Zeiss, Jena, Deutschland
IBM SPSS Statistics For Macs Version 28.0	IBM Corp., Armonk, NY, USA
Leica Application Suite X (LAS X)	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

## 7.2 Methoden

### 7.2.1 Laserkoagulation

Zunächst wurden die Pupillen der Tiere mittels Phenylephrin-Tropicamid-Augentropfen erweitert. Danach erfolgte eine gewichtsadaptierte intraperitoneale Anästhesie mittels einer Lösung aus 5,63mg/ml Ketamin, 0,85 mg/ml Xylazin und 0.9% NaCl (8: 3: 60) in 14 IE pro 20g Körpergewicht. Ein Coverslip zusammen mit einem Tropfen Methocel 2% fungierte als Kontaktglas. Anschließend wurde mit einem Argonlaser jeweils ein Laserspot pro Netzhaut-Quadrant möglichst um den Sehnervkopf gesetzt. Folgende Einstellungen wurden dabei verwendet: 120 mW Leistung, 50 µm Durchmesser, 100 ms Dauer. Bei einer Blasenbildung wurde von einer erfolgreichen Induktion der CNV durch Ruptur der Bruch'schen Membran ausgegangen. Die Augen wurden anschließend mit Corneregel Augengel befeuchtet und die Tiere bis zum Erwachen überwacht.

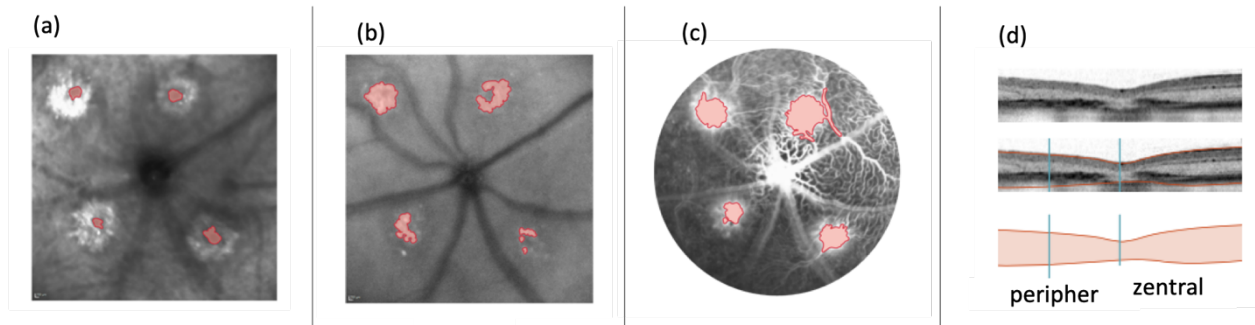
In dem vorliegenden Experiment wurden die Tiere durch zwei unterschiedliche Personen gelasert. Die Zusammenarbeit erfolgte mit Inga-Marie Pompös, PhD-Studentin, sowie PD Dr. med. Anna-Karina Maier-Wenzel, Oberärztin der Augenklinik der Charité. Um einen Unterschied zwischen den Geschlechtern durch diesen Störfaktor zu verhindern, wurde darauf geachtet, dass beide Personen die gleiche Anzahl an Weibchen und Männchen zugewiesen bekommen haben.

### 7.2.2 *Bildgebung in vivo*

7 und 14 Tage nach Laser-Photokoagulation wurden bildgebende Verfahren wie Infrarot-Reflexion (IR), Optische Kohärenztomografie (OCT), Fluoreszenz-Angiographie (FA) und BluePeak Blue Laser Autofluoreszenz (BAF) angewandt. Die Durchführung erfolgte dabei durch Sergej Skosyrski, Biologisch-Technischer Assistent. Die Kontrolltiere waren zu diesem Zeitpunkt 9 bzw. 10 Wochen alt. Zunächst wurden den Tieren erneut die Pupillen dilatiert und sie narkotisiert (s. Kapitel 7.2.1). Um Hornhauttrübungen vorzubeugen, erhielten die Tiere befeuchtende Augentropfen von Hylo Vision. Bevor die Aufnahmen am Spectralis HRA + OCT gestartet werden konnten, wurden spezielle Objektive mit einer 30° und 50° Linse für Nagetiere befestigt. IR-Bilder wurden dann im IR-Modus (Diodenlaser, Wellenlänge 820 nm) aufgenommen, OCT-Bilder im OCT-IR-Kombinationsmodus (Superlumineszenz Diode, Wellenlänge 870 nm). Für die BAF wurde der BAF-Modus (blauer Festkörperlaser, Wellenlänge 488 nm, ohne Sperrfilter) verwendet und dessen Einzelbilder automatisch gemittelt (ART mean function). Nach subkutaner Injektion von Fluoreszein (5 mg/kg) wurde 10 Minuten später die Fluoreszenzangiographie im FA-Modus (blauer Festkörperlaser, Wellenlänge 488 nm, Sperrfilter 500 nm, späte Phase) durchgeführt. Anschließend wurden die Bilder über die Heidelberg Eye Explorer Software gespeichert und pathologische Veränderungen verblindet mittels Fiji Software beurteilt.

Hierbei wurde wie folgt vorgegangen (s. Abbildung 2): Die FA-Bilder wurden importiert und anhand des angegebenen Maßstabs durch die Heidelberg Eye Explorer Software zunächst mit dem Umrechnungsfaktor 0,14 Pixel / $\mu\text{m}$  skaliert. Derartig wurde auch mit den nachfolgenden Bildgebungsmodi verfahren. Anschließend wurde jede Fläche des Fluoreszein-Austrittes mit dem Wand Tool markiert und in  $\text{mm}^2$  berechnet. Die Werte der einzelnen Flächen wurden gemittelt, um die mittlere laser-induzierte vaskuläre Leckage pro Tier im Geschlechtervergleich zu erhalten. Bei den BAF-Bildern wurden die hyperautofluoreszierenden Ablagerungen pro Laserkoagulation vermessen. Dazu wurde mittels der Threshold-Methode „Default“ das Minimum und Maximum der Helligkeit so reguliert, dass die zu analysierenden Flächen von dem restlichen Fundus abgegrenzt waren. Mit dem Wand Tool konnte die exakte Fläche bei Bedarf modifiziert und anschließend die Fläche in  $\text{mm}^2$  berechnet werden. Hiernach wurden die Mittelwerte der erhöhten Autofluoreszenz pro Tier analysiert. Die IR-Bilder wurden hinsichtlich der Fläche des Gewebes Schadens im einzelnen Bereich der Laserwirkung ausgewertet. Dies erfolgte über die Messung der hyporeflektiven Flächen mit dem Wand Tool. In den OCT-Bildern konnte die Retina mittels Heidelberg Eye Explorer Software im Sagittalschnitt unter dem Reiter „Thickness Profile“ von Innerer Grenzmem-

ran (ILM bis zur Basalmembran (BM)) eingeteilt werden. Die Atrophie in  $\mu\text{m}$  als Differenz zwischen der peripheren Retinadicke und dem Bereich der Laserkoagulation wurde anschließend verglichen.



**Abbildung 2.** Analyse der Pathologie in den einzelnen Bildgebungsmodalitäten.

Mittels Markierung über die Fiji Software wurde die Größe der jeweiligen Pathologie ermittelt und als mittlere Fläche pro Laserherd bzw. als Atrophie pro Laserherd angegeben. Die jeweiligen Flächen, die für die Berechnung der Parameter genutzt wurden, sind hier exemplarisch durch die hellroten Markierungen dargestellt **a)** Nahinfrarotreflexion (IR), **b)** Blue-Peak-Blue Laser Autofluoreszenz (BAF), **c)** Fluoreszenzangiografie (FA), **d)** Optische Kohärenztomografie (OCT). Quelle: eigene Darstellung

### 7.2.3 Immunhistochemische Färbung von Retinasagittalschnitten

Um eine Angiogenese und Änderung der Gliazellaktivität nach Laserkoagulation im Auge der Tiere sichtbar machen zu können, wurden diese 15 Tage nach dem Lasern enukleiert. Die Augen wurden 2h in 4%- Paraformaldehydlösung und über Nacht in 70% Ethanol fixiert. Das Gewebe wurde an Frau Karin Oberländer, technische Assistentin, versendet, welche dieses in Paraffin einbettete und aus den Augen 5  $\mu\text{m}$  dicke Sagittalschnitte fertigte. Für die Immunhistochemische Färbung wurden die Schnitte zunächst deparaffiniert und über eine Alkoholreihe aus Xylol, Isopropanol und Ethanol absteigender Konzentration für insgesamt 60 Minuten rehydriert. Die gleichzeitige Demaskierung der spezifischen Antigene VEGF-A und GFAP erfolgte hitzeinduziert mittels Citratpuffer und Mikrowelle (4 Minuten bei 600 W). Im nächsten Schritt wurden die Zellmembranen mit 0,5 % Triton-X-100 in TBS permeabilisiert. Anschließend wurden die Schnitte mit TBS für 3 x 3 Minuten gewaschen und unspezifische Bindungsstellen für eine Stunde mit 5% BSA in TBS geblockt. Die primären Antikörper VEGF-A und GFAP (Tabelle 7) wurden über Nacht bei 4° Celsius in der Antikörperlösung I inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS für 3 x 3 Minuten und Dunkel-Inkubation für eine Stunde mit einem geeigneten sekundären Antikörper (Tabelle 7) und DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 1:100 in TBS), wurden die Schnitte ab-

schließlich fixiert. Dies erfolgte mit Fluorescent Mounting Medium auf den jeweiligen Objektträgern. Die Schnitte wurden nun am Axio Imager M2 Fluoreszenz Mikroskop mit der ZEN lite 2012 Software quantitativ analysiert.

**Tabelle 7.** Immunhistochemische Färbung von Retinasagittalschnitten

<b>Pri- mär- anti- körper</b>	<b>Verdün- nung Primäran- tikörper</b>	<b>Fixie- rung</b>	<b>Antigendemaskierung/ Inkubationszeit</b>	<b>Blocking buf- fer/Kon- zentration</b>	<b>Sekundär antikörper</b>	<b>Verdünnung Sekun- därantikör- per</b>
Anti- VEGF- A	1: 100	4% PFA	Mikrowelle bei 600 Watt in Citratpuffer (pH 6) / 4 Mi- nuten Eis / 20 Minuten	BSA in TBS/ 5%	Alexa Fluor ® 488, don- key anti-rab- bit	1: 250
Anti- GFAP	1: 200	4% PFA	Mikrowelle bei 600 Watt in Citratpuffer (pH 6) / 4 Mi- nuten Eis / 20 Minuten	BSA in TBS/ 5%	Alexa Fluor ® 649, don- key anti- guinea pig	1: 250

#### 7.2.4 Quantifizierung der GFAP- und VEGF-A-Expression

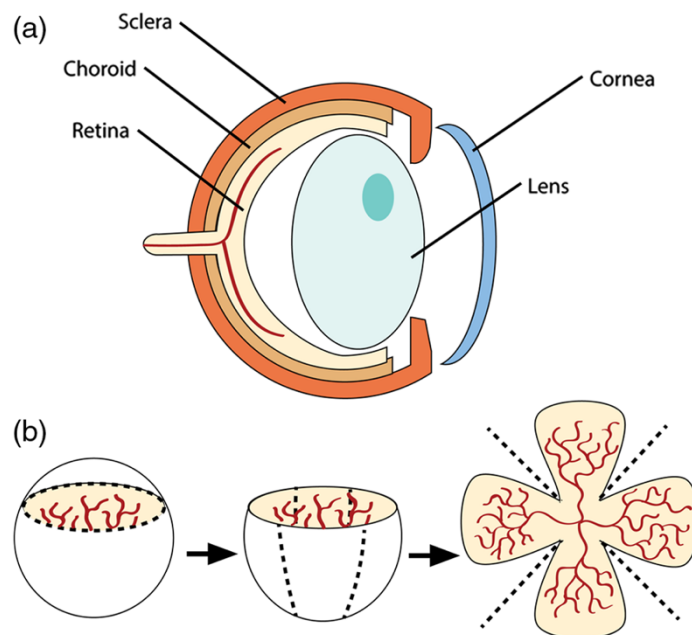
Die Paraffinschnitte wurden mittels 20er/0,5NA Objektiv am in Kap.7.2.3 erwähnten Mikroskop untersucht und aufgenommen. Da 15 Tage nach Laserkoagulation keine CNV oder Ruptur der Bruch'schen Membran auf den Schnitten erkennbar war, um die lokale Gliazellaktivität bzw. Vaskulogenese zu untersuchen, wurde jeder 10. Schnitt des Auges aufgenommen. Ein vorhergehender Vergleich mit Schnitten aus der Arbeitsgruppe mit sichtbarer Narbe bestätigte, dass die dortige GFAP- und VEGF-A-Expression 10 Schnitte hinter der Narbe gleichmäßig in der Retina bzw. subretinal zu finden war. Es wurden daher insgesamt vier Schnitte pro Auge von elf Tieren analysiert. So konnte eine Messung der mittleren Inflammationsreaktion der Retina des Tieres durchgeführt werden.

Als GFAP-Expression wurde eine spezifische Färbung gegen Gliazellartige Zellen in der Ganglienzellschicht (GCL) der Retina mit Ausläufern bis in die äußere Körner- (ONL) bzw. äußere Grenzsicht (OLM) klassifiziert. Eine spezifische VEGF-A-Expression wurde angenommen, wenn sich ein Signal subretinal bzw. suprachoroidal als Zeichen einer Vaskulogenese zeigte. Bei jeder Aufnahme wurde ein zentrumsnaher Abstand zur Papille des Nervus opticus gewählt.

Als Quantifizierungsmethode wurde die Berechnung der Intensität mittels Integrierter Dichte über die in Tabelle 6 angegebene Fiji ImageJ Software angewandt. Hierzu wurden die aufgenommenen RGB - Bilder der Größe 447µm x 335µm verblendet importiert und die einzelnen Farbkanäle getrennt. Anschließend wurde die Integrierte Dichte (Produkt aus mittlerer Grauwert x Fläche) über die gesamte Bildfläche berechnet.

### 7.2.5 Herstellung und Immunhistochemische Färbung von Flachpräparaten

15 Tage nach dem Laser wurden die Augen enukleiert. Zunächst wurden sie für 12 Minuten in 4% -Paraformaldehydlösung fixiert und 15 Minuten mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Die Präparation der Retina und Choroidea mit Sklera erfolgte dann folgendermaßen: Erst wurde durch kreisförmige Inzision der Cornea entlang des Limbus das Auge eröffnet, um Linse, Kammerwasser und Glaskörper entfernen zu können. Anschließend wurde das hintere Augensegment viermal kleeblattförmig eingeschnitten (Abbildung 3). Die transparente Retina wurde oberhalb des dunklen retinalen Pigmentepithels (RPE) durch Abheben und Lösen vom Sehnervkopf getrennt. Beide Proben (Retina = eine Probe und RPE mit Bruch'scher Membran, Choroidea und Sklera = andere Probe, im Folgenden als „Choroidea“ abgekürzt) konnten dann in Methanol bei 20 Grad Celsius aufbewahrt werden. Die weitere Färbung erfolgte durch 3x 10-minütiges Waschen mit Tris-gepufferter



**Abbildung 3.** Schematische Darstellung zur Herstellung von Flachpräparaten.

Zum hinteren Augenabschnitt zählen Sklera, Choroidea und Retina. Durch diesen Prozess entstanden zwei unterschiedliche Flachpräparate. **(a)** Grobe Anatomie des Auges, vergleichbar mit der von Mäusen. **(b)** Arbeitsablauf der Probenvorbereitung. Anschließende Trennung der Retina von der Choroidea mit Sklera. Quelle: Entnommen aus (91)

Salzlösung (TBS) und anschließende 10-minütige Inkubation mit 5% Triton-X-100 in TBS zur Permeation des Gewebes. Danach wurden die Proben für eine Stunde zeitgleich permeabilisiert und unspezifische Epitope mit einer Lösung aus 1 % Triton-X-100, 5% Bovines Serumalbumin (BSA), 5% Donkey Serum und TBS geblockt. Die Inkubation mit dem gewünschten Antikörper (s. Tabelle 8) erfolgte für 48h bei 4 Grad Celsius mit 10% Donkey Serum in TBS. Anschließend

wurde für 3x 10 Minuten mit 0,5 % Tween -20 in TBS gewaschen. Spezies-geeignete sekundäre Antikörper wurden ausgewählt (s. Tabelle 8) und zusammen mit DAPI (1:50) für 2 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem mehrmaligem Waschen wurde das Gewebe auf einen Objektträger aufgebracht und unter einem Leica TCS SPE Konfokalmikroskop analysiert. Iba1- und P2RY12-positive Zellen wurden auf der Retina und P2RY12-positive Zellen auf der Choroidea manuell und verblindet ausgezählt. Das Narbenvolumen auf der Choroidea wurde mit CD 102 und Isolectin B4 markiert.

**Tabelle 8.** Immunhistochemische Färbung von Flatmounts

<b>Primärantikörper/Probe</b>	<b>Verdünnung Primärantikörper</b>	<b>Fixierung</b>	<b>Antigendemaskierung/Inkubationszeit</b>	<b>Blocking buffer/Konzentration</b>	<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung Sekundärantikörper</b>
GS Isolectin-IB4, Alexa Fluor ® 647-Konjugat / <b>Retina</b>	1:250	4% PFA in TBS, Methanol	5% Triton-X-100 in TBS / 10 Minuten	Donkey Serum in TBS / 10 %		1:250
Anti-Iba-1 / <b>Retina</b>	1:250	4% PFA in TBS, Methanol	5% Triton-X-100 in TBS / 10 Minuten	Donkey Serum in TBS / 10 %	Alexa Fluor ® 488 donkey anti-goat	1:250
Anti-P2Y12 / <b>Retina</b>	1:250	4% PFA in TBS, Methanol	5% Triton-X-100 in TBS / 10 Minuten	Donkey Serum in TBS / 10 %	Cy3 donkey anti-rabbit	1:250
GS Isolectin-IB4, Alexa Fluor ® 488-Konjugat/ <b>Choroidea</b>	1:250	4% PFA in TBS, Methanol	5% Triton-X-100 in TBS / 10 Minuten	Donkey Serum in TBS / 10 %		1:250
Anti-CD102 / <b>Choroidea</b>	1:250	4% PFA in TBS, Methanol	5% Triton-X-100 in TBS / 10 Minuten	Donkey Serum in TBS / 10 %	Alexa Fluor ® 408 goat anti-rat	1:250
Anti-P2Y12 / <b>Choroidea</b>	1:250	4% PFA in TBS, Methanol	5% Triton-X-100 in TBS / 10 Minuten	Donkey Serum in TBS / 10 %	Cy3 donkey anti-rabbit	1:250

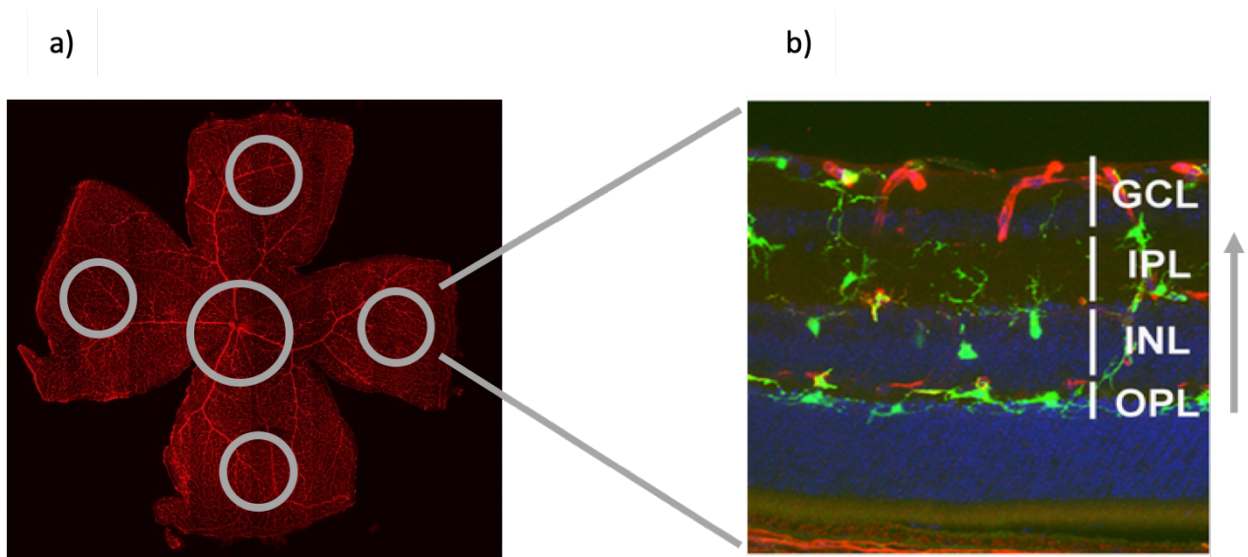
### 7.2.6 Quantifizierung von Iba-1- und P2Y12-positiven Zellen

Iba-1 und P2RY12-positive Zellen wurden als Zstacks am Leica TCS SPE Konfokalmikroskop mit der Leica Application Suite X Software aufgenommen.

Iba-1-positiv galt als spezifische Färbung (Wellenlängenbereich 488 nm) gegen Mikrogliazellartige Zellen mit verzweigten Ausläufern oder in amöboider Form in der IPL- und OPL-Schicht der Retina. P2RY12-positiv wurde ebenso, jedoch im Farbkanal mit dem Wellenlängenbereich 532nm, klassifiziert.

Um die geschlechtsspezifische Dichte und mögliche Migration von Mikroglia nach Laserläsion zu analysieren, wurden P2RY12- und Iba-1-positive Zellen auf den Retina-Flachpräparaten sowohl

mit einem Bild zentral um die Papille als auch mit einem peripheren Scan in jedem Kleeblatt vermessen (Abbildung 4a). Dies erfolgte zentral am 20er /0,60 NA- Öl- und peripher unter dem 40er/1,15 NA-Öl-Objektiv. Die Tiefe der Scans reichte von IPL- zur OPL-Schicht, welche beide durch zusätzliche Isolectin-Färbung von der zellreichen, DAPI-positiven inneren Körnerschicht (INL) unterscheidbar waren (Abbildung 4b). Pro Tier wurden insgesamt fünf Scans - ein zentraler und vier periphere Scans - untersucht. Die vier peripheren Scans bildeten dabei zusammen die Bildgröße des zentralen Scans ab.



**Abbildung 4.** Verfahren zur Quantifizierung der Mikroglia-dichte auf retinalen Flachpräparaten.

**a)** Die Retina wurde in ihrem Zentrum um den Nervus opticus bzw. der Papille und zusätzlich viermal in kleinerem Ausschnitt in der Peripherie aufgenommen, sodass die Bildgröße der Peripherie mit der im Zentrum vergleichbar war. Rot = Färbung des intraretinalen Gefäßplexus mittels Isolectin GS-IB<sub>4</sub> **b)** Die Aufzeichnung am Leica TCS SPE Konfokalmikroskop reichte von der OPL bis zur IPL. Die gewünschten Retinaschichten wurden mittels des Lokalisationsvergleiches der Gefäße in IPL und OPL bzw. der Gegenfärbung der Zellkerne aus den Körnerschichten (INL/ONL) identifiziert. Rot = Färbung des intraretinalen Gefäßplexus mittels Isolectin GS-IB<sub>4</sub>. Grün= Färbung gegen Mikroglia. Blau = DAPI-Färbung der Zellkerne. Quelle: links eigene Darstellung, rechts entnommen aus (92)

GCL=Ganglienzellschicht, IPL= innere plexiforme Schicht, INL= innere Körnerschicht, ONL= äußere Körnerschicht, OS= Außensegmente der Photorezeptoren.

Auf den Choroidea-Flachpräparaten wurden P2RY12-positive Zellen unter dem 20er-Objektiv peripher der Narbe mit der Narbe im Zentrum des Bildes ausgezählt. Die Höhe der Scans war abhängig von der Größe der Narbe. Pro Tier wurden vier Scans für die jeweilige Narbe aufgenommen.

Quantifiziert wurden die Zellen mittels Fiji Software. Hierzu wurden die konfokalen Scans der Choroidea und zentralen Retina als 8bit-Bilder der Fläche 551 µm x 551 µm und n x 1,63 µm Höhe und die Scans der peripheren Retina mit der Bildgröße 275 µm x 275 µm x n x 0,44 µm



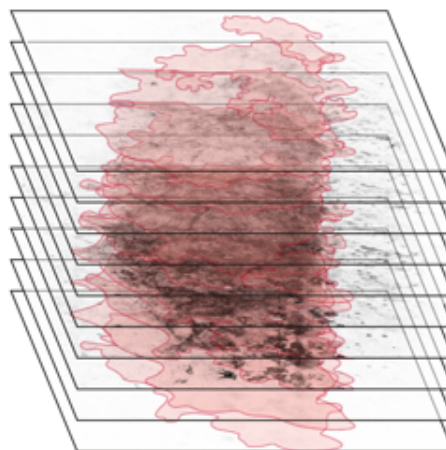
importiert. Die einzelnen Stacks wurden dann nach Farbkanal getrennt, via „Z-Project“ übereinandergelegt und die Zellen mittels „Cell Counter“ ausgezählt. Durch die DAPI-Färbung konnten dabei einzelne Zellen identifiziert werden. Angegeben wurde die mittlere Zellzahl pro Geschlecht um die entstandene Narbe sowie die mittlere Zellzahl pro Ebene und Geschlecht in der Retina im Vergleich Zentrum zur Peripherie und zu nicht gelaserten Tieren.

#### 7.2.7 Quantifizierung der laserinduzierten CNV ex vivo

Die laser-induzierten Choroidalen Neovaskularisationen (CNV) wurden als Zstack am Leica TCS SPE Konfokalmikroskop mit der Leica Application Suite X Software unter dem 20er/ 0.7 NA ÖL - Objektiv aufgenommen.

Als CNV wurde dabei eine Isolectin GS-IB<sub>4</sub>- und CD102-positive, rundartige Gefäßformation im RPE-Choroidea-Flachpräparat klassifiziert.

Zur Quantifizierung wurden die 8bit-Scans der Größe 551 µm x 551 µm und n x 1,63 µm Höhe mittels Fiji Software importiert. Anschließend wurden die Farbkanäle separiert, die Scans in Einzelbilder zerlegt und die fluoreszierenden Flächen pro Ebene per Wand Tool ermittelt (Abbildung 5). Falls das Tool nicht die exakte Fläche einbezog, wurde der Befehl „Find Edges“ angewandt und die zu analysierende Fläche modifiziert. Das CNV-Volumen wurde schließlich als Produkt aus Fläche x Höhe der einzelnen Ebenen berechnet. Angegeben wurde das mittlere CNV-Volumen pro Tier im Geschlechtervergleich.



**Abbildung 5.** Strategie zur Quantifizierung des CNV-Volumens.

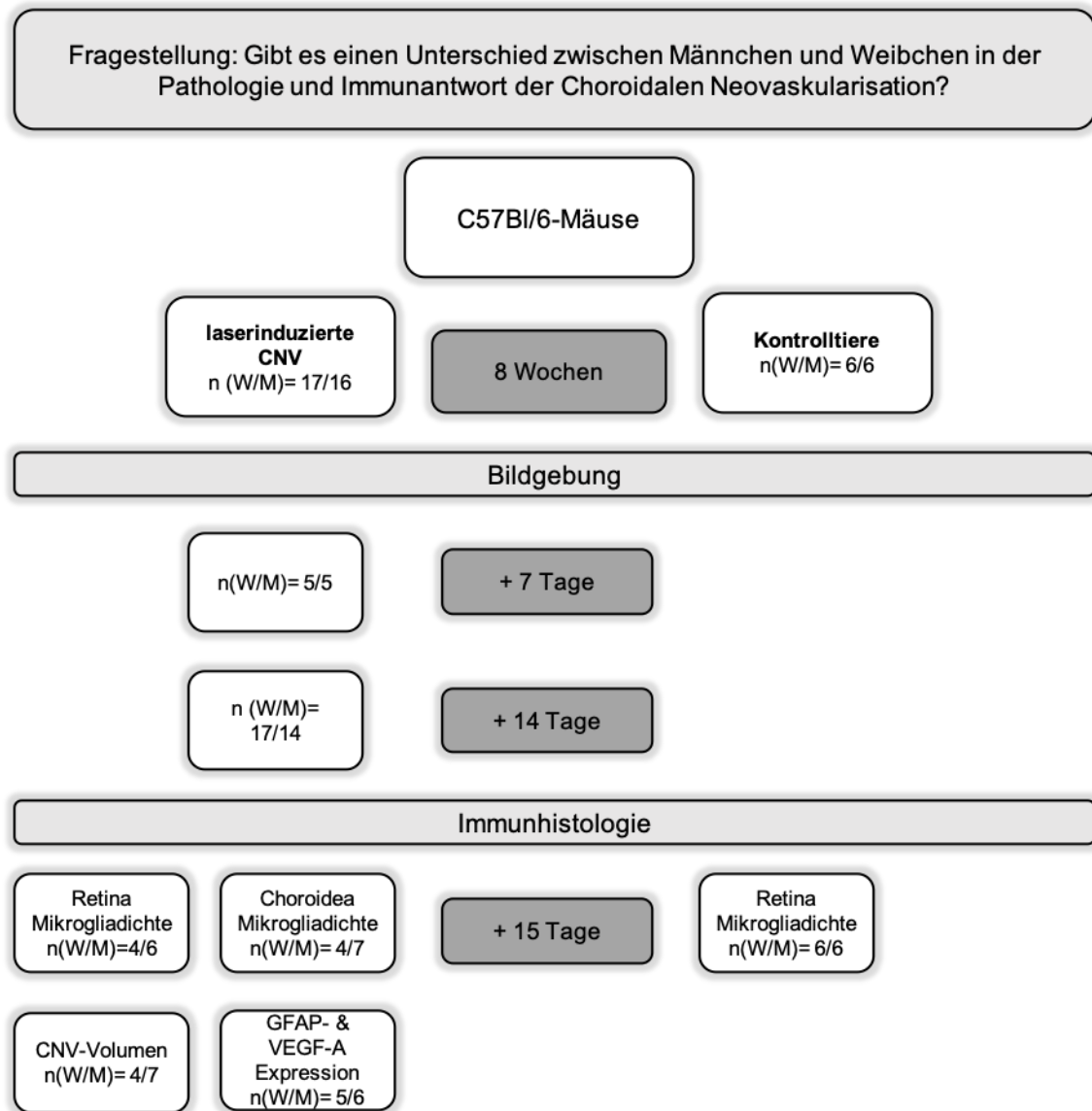
Quelle: eigene Darstellung

### 7.2.8 *Statistische Auswertung*

Alle Daten wurden mit Microsoft Excel Version 16.29 und der Statistiksoftware SPSS Version 28.0 ausgewertet. Zunächst wurden die Analysen verblindet durchgeführt. Anschließend wurden sämtliche Daten mittels Shapiro-Wilk-Test auf eine Normalverteilung getestet. Die Werte wurden als Mittelwerte +/- SEM erfasst und deren Aussagekraft durch den ungepaarten T-Test untersucht. Bei der Analyse von verschiedenen Zeitpunkten wurde der gepaarte T-Test angewandt und bei zwei kategorialen unabhängigen Werten im Falle der Mikroglia-dichte der Retina eine zweifaktorielle ANOVA verwendet. Statistische Signifikanz wurde wie folgt abgebildet: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

## **8 Ergebnisse**

## 8.1 Experimentelles Design



**Abbildung 6.** Experimentelles Design.

Dargestellt ist die Versuchsplanung mit der Anzahl (n) an Tieren nach Ausschluss. Hauptfokus war eine Analyse der Pathologie der laserinduzierten CNV hinsichtlich eines Geschlechtsunterschieds nach 14 bzw. 15 Tagen, 10 Tiere wurden zusätzlich zum Zeitpunkt „7 Tage“ mittels Bildgebung untersucht. Quelle: Eigene Darstellung

Um einen Unterschied zwischen Männchen und Weibchen in der Antwort auf eine laser-induzierte CNV festzustellen, wurden insgesamt 33 Tiere mit 17 Weibchen und 16 Männchen gelasert (Abbildung 6). Begonnen wurde hierbei mit 22 Tieren, um die Immunreaktion mittels Bildgebung und Immunhistologie 14 und 15 Tage nach Laserkoagulation zu ermitteln. Während der Datenanalyse wurde jedoch festgestellt, dass die Befunde nur gering ausgeprägt waren. Daher wurde vermutet, dass sich eine Dynamik schon eher auszubilden schien, sodass weitere 10 Tiere mit 5 Weibchen

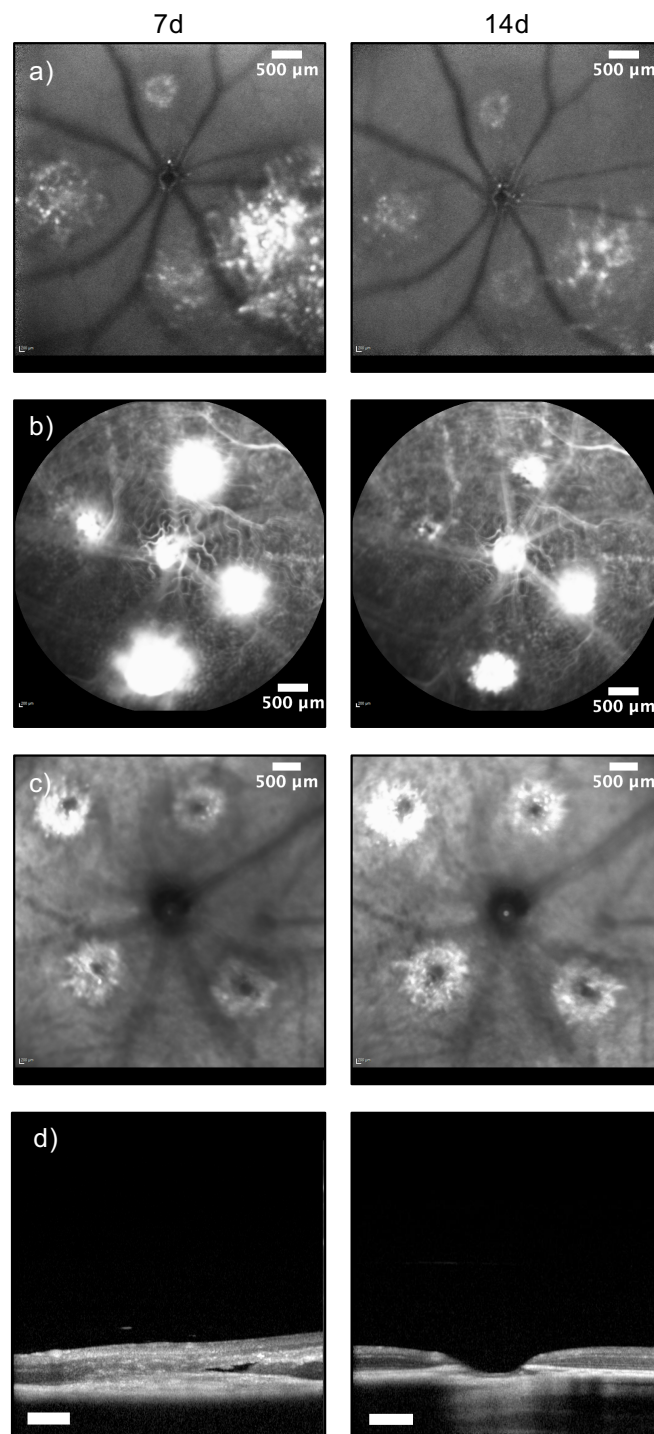
und 5 Männchen 7 Tage nach Laser untersucht wurden. Diese 10 Tiere flossen ebenfalls in die Analyse der restlichen Methoden ein, jedoch blieb der Hauptfokus der Gesamtanalyse beim späteren Zeitpunkt.

Daten der Bildgebung wurden für die Analyse ausgeschlossen, wenn sich konfluierende Gewebereaktionen aufgrund eines unzureichenden Abstands beim Setzen der Laserherde zeigten (n= 2 Männchen).

Zur Analyse der Mikroglia-dichte und des CNV-Volumens wurden die Augen von 21 Tieren mit 10 Männchen und 11 Weibchen immunhistochemisch auf Flachpräparaten der Retina und Choroidea gefärbt. Bei den Retinasagittalschnitten waren dies Augen von 12 Tieren mit 6 Männchen und 6 Weibchen. Daten wurden ausgeschlossen, wenn eine CNV-Läsion in den Choroidea-Flachpräparaten nicht lokalisiert werden konnte.

Um die Mikroglia-dichte von gelaserten mit naiven Tieren zu vergleichen, wurden 12 Kontrolltiere mit 6 Männchen und 6 Weibchen in die Analyse eingeführt und ihre Augen ebenfalls gegen anti-Iba1 und anti-P2RY12 auf retinalen Flachpräparaten gefärbt. Daten wurden ausgeschlossen, wenn Fehler bei der Gewebeverarbeitung auftraten.

## 8.2 Bildgebung der Pathologie



**Abbildung 7.** Bildgebung im Zeitverlauf.

Dargestellt sind repräsentative Bilder für die jeweilige Bildgebungsmodalität von  $n=10$  Tieren. **a)** Zwischen den Zeitpunkten 7 und 14 Tage nach Laserapplikation zeigte sich in der BAF deskriptiv eine Abnahme der fokalen Autofluoreszenz im Bereich der einzelnen Laserherde. **b)** In der FA schien sich die Gefäßleckage im Zeitverlauf zu reduzieren, allerdings nicht signifikant. **c)** In der IR blieb die hyporeflektive Fläche im Zentrum des Laserherds ähnlich groß. **d)** In der OCT sah man zum Zeitpunkt 7 Tage teilweise eine subretinale Flüssigkeitseinlagerung (schwarz) und fibrovaskuläres Gewebe, im Zeitverlauf jedoch eine deutliche Atrophie. Maßstabsbalken = 500 µm. Quelle: Eigene Darstellung.

Eine Bildgebung der laserinduzierten CNV fand zu den Zeitpunkten 7 und 14 Tage nach Laserkoagulation statt (Abbildung 7).

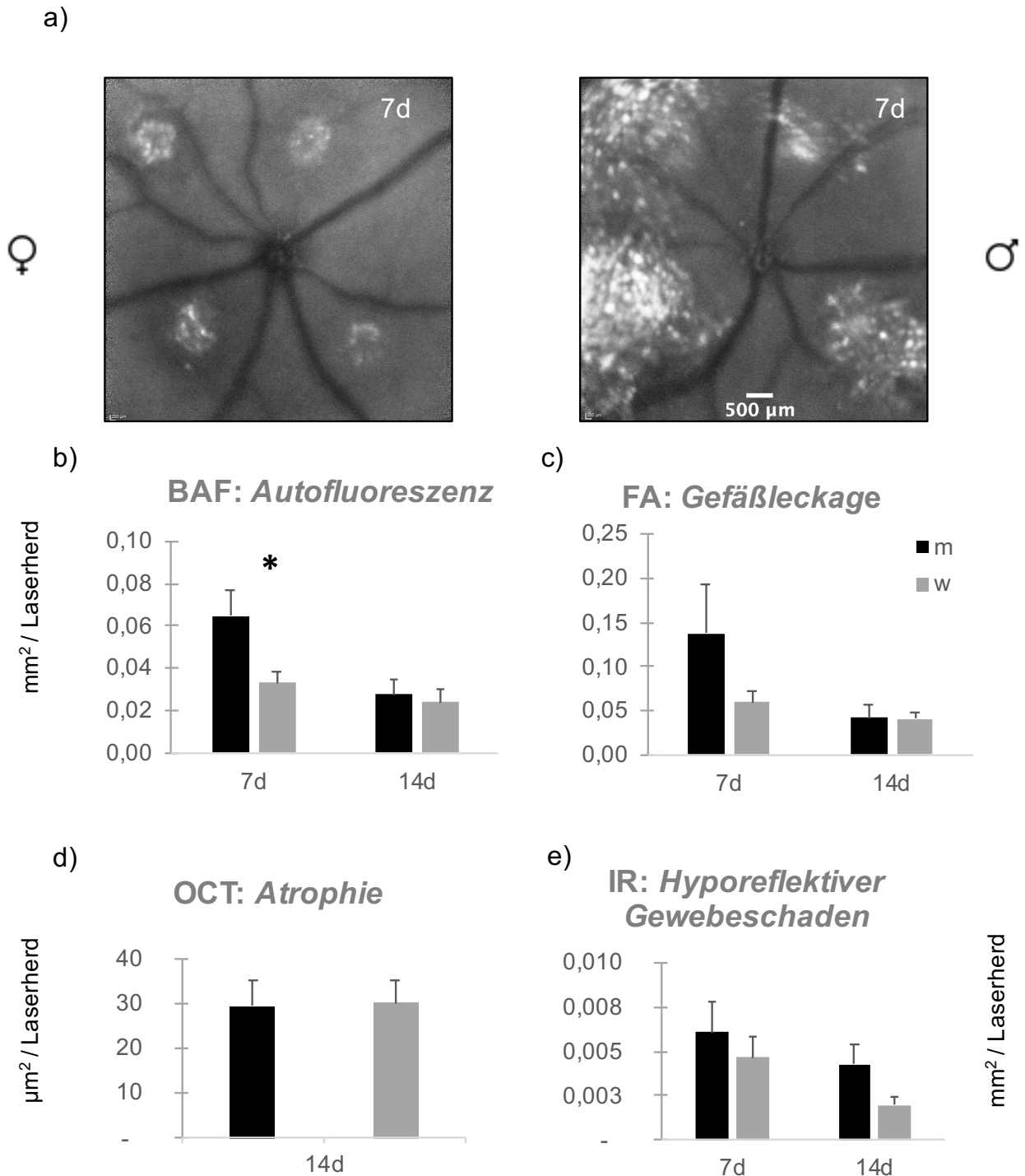
In der BAF stellten sich zu beiden Zeitpunkten erhöhte autofluoreszierende Areale dar. Diese waren fokal auf den Bereich der Laserherde begrenzt und konfluieren teilweise zwischen den einzelnen Laserherden und im einzelnen Laserherd. Männchen (M) zeigten 7 Tage nach Laserkoagulation eine signifikant größere Autofluoreszenz (AF) als Weibchen (W) [ $0,065 \text{ mm}^2$  (M) vs.  $0,033 \text{ mm}^2$  (W),  $n(W/M) = 5/5$ ,  $t(8) = -2,4$ ,  $p = 0,043$ ] (Abbildung 8a,b). Zum Zeitpunkt 14 Tage gab es keinen Unterschied in der autofluoreszierenden Fläche zwischen den Geschlechtern [ $0,027 \text{ mm}^2$  (M) vs.  $0,024 \text{ mm}^2$  (W),  $n(W/M) = 12/15$ ,  $t(19,47) = -0,973$ ,  $p = 0,39$ ] (Abbildung 7b). Die Autofluoreszenz nahm im Zeitverlauf um durchschnittlich  $0,002 \text{ mm}^2$  ab und blieb daher ähnlich groß [ $n = 10$ , 95%-CI [-0,18, 0,14]],  $t(9) = -0,308$ ,  $p = 0,76$ ] (Abbildung 7a).

In der Fluoreszenz-Angiografie (FA) stellte sich in der untersuchten Spätphase zu beiden Zeitpunkten im Bereich der Laserherde ein hyperfluoreszierender Austritt von Fluoreszein dar. Die Größe der Gefäßleckage wies dabei zwischen den einzelnen Tieren eine hohe Streuung auf. Ein Unterschied der Gefäßleckage im Zeitverlauf ließ sich nicht feststellen [ $-0,01 \text{ mm}^2$ ,  $n=10$ ,  $t(9) = -0,72$ ,  $p = 0,49$ ] (Abbildung 7b, 8c). 7 Tage nach Laserkoagulation war die mittlere Leckage bei den Männchen pro Tier  $0,13 \pm 0,06 \text{ mm}^2$  groß, während sie bei den Weibchen eine Fläche von  $0,06 \pm 0,01 \text{ mm}^2$  maß (Abbildung 8c). Der Unterschied in der Fläche der Gefäßleckage war hiermit nicht signifikant [ $n(W/M) = 5/5$ ,  $t(4,3) = -1,3$ ,  $p = 0,25$ ]. Ebenso verhielt es sich 14 Tage nach Setzen der Laserherde [ $0,045 \text{ mm}^2$  (M) vs.  $0,044 \text{ mm}^2$  (W),  $n(W/M) = 17/14$ ,  $t(29) = -0,058$ ,  $p = 0,95$ ] (Abbildung 8c).

In der IR zeigten sich sowohl hyperreflektive als auch hyporeflektive Zonen im Bereich der Laserherde. Die hyperreflektiven kreisförmigen Areale entsprachen in etwa der Größe der Autofluoreszenz in der BAF, wirkten jedoch in der IR konfluierender. Die hyporeflektiven Areale im Zentrum des Laserherdes wurden daher in ihrer Fläche als Zeichen für den entstandenen Gewebeschaden vermessen. 7 Tage nach Laserkoagulation zeigte sich kein Unterschied zwischen den Männchen und Weibchen [ $0,006 \text{ mm}^2$  (M) vs.  $0,005 \text{ mm}^2$  (W),  $n(W/M) = 5/5$ ,  $t(8) = -0,7$ ,  $p = 0,5$ ] (Abbildung 8e). Nach 14 Tagen blieb das Verhältnis gleich, auch wenn die Männchen in der Tendenz deutlicher als nach 7 Tagen betroffen waren [ $0,005 \text{ mm}^2$  vs.  $0,002 \text{ mm}^2$ ,  $n(W/M) = 11/14$ ,  $t(15) = -1,7$ ,  $p = 0,09$ ]. Im Zeitverlauf reduzierte sich die hyporeflektive Fläche bei beiden Geschlechtern deskriptiv (Abbildung 7c), ist jedoch mit einer Differenz von  $0,0002 \text{ mm}^2 \pm 0,001$  nicht signifikant [ $n = 10$ ,  $t(9) = 0,22$ ,  $p = 0,8$ ] (Abbildung 8e).

In der OCT zeigte sich 14 Tage nach Laserkoagulation bei beiden Geschlechtern eine retinale Atrophie im Bereich der Laserherde (Abbildung 7d). Diese Atrophie war bei den Männchen tendenziell größer, zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied zu den Weibchen [ $32 \mu\text{m}$  vs.  $29 \mu\text{m}$ ,  $n(\text{W/M}) = 10/11$ ,  $t(20) = -0,34$ ,  $p = 0,74$  (Abbildung 8d)]. 7 Tage nach Setzen der Laserherde wiesen die Tiere keine Atrophie bzw. Änderung der Retinaschichtdicke auf. Stattdessen waren subretinale Blutungen erkennbar (Abbildung 7d).

Eine Zusammenschau der Ergebnisse aus der Bildgebung wird in Abbildung 8 dargestellt.



**Abbildung 8.** Übersicht der Ergebnisse in der Bildgebung.

a) Repräsentatives Bild für Weibchen und Männchen in der BAF zum Zeitpunkt „7 Tage“. b) Männchen wiesen 7 Tage nach Laserkoagulation eine signifikant größere Autofluoreszenz pro Laserherd auf als Weibchen (n (W/M) = 5/5, p= 0,043). c) In der FA zeigte sich kein Unterschied im Zeitverlauf und zwischen dem Geschlecht (n (7d) = 10, n (14d) = 31). d) Die erkennbare Atrophie im OCT war ähnlich groß zwischen Männchen und Weibchen (n (W/M) = 10/11). e) Darüber hinaus war die Ausprägung einer hyporeflektiven Fläche zwischen dem Geschlecht ähnlich und änderte sich nicht signifikant im Zeitverlauf (n(7d) = 10, n(14d) = 25). Die Daten wurden als Mittelwerte +/- SEM angegeben. Quelle: Eigene Darstellung.

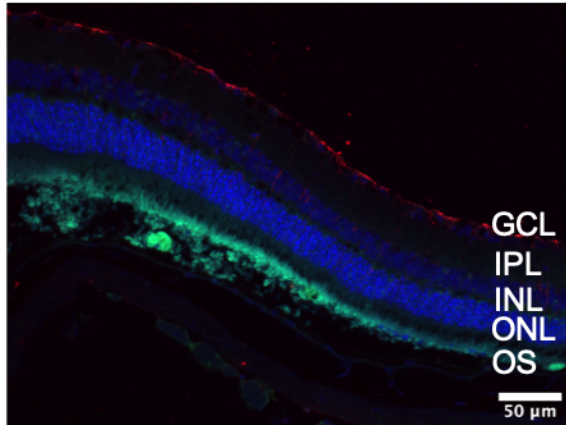


### 8.3 GFAP- und VEGF-A- Expression

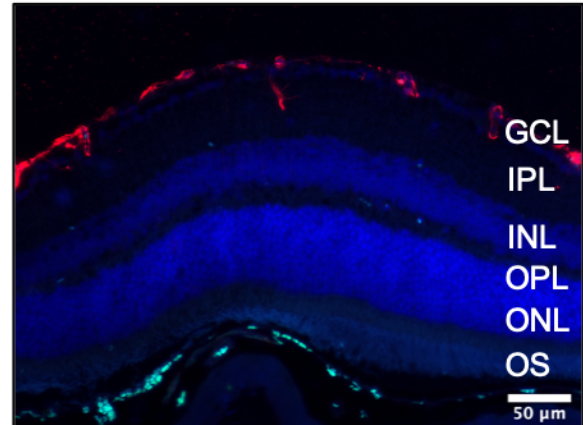
Retinsagittalschnitte wurden mit anti-VEGF-A, einem Signalmolekül, das an der Angiogenese beteiligt ist und im vaskulären Gewebe auftritt(93), immunhistologisch gefärbt. Dieses begrenzte sich bei beiden Geschlechtern fokal auf den subretinalen Raum, dem Ort der Chemotaxis und Einsprossung undichter Gefäße nach Zerstörung der Bruch'schen Membran durch Laserkoagulation (Abbildung 9a,b) . Bei den Männchen manifestierte sich hierbei eine stärkere VEGF-A-Expression als bei den Weibchen [6998  $\mu\text{m}^2$  (M) vs. 2343  $\mu\text{m}^2$  (W), n (W/M) = 5/6, t(9)= -7,3, p < 0,001] (Abbildung 9a,b,c).

Bei der immunhistologischen Färbung der Retinaschnitte gegen Gliafilament-Protein (GFAP), einem Gliazellmarker aktivierter Astrozyten und Müllerzellen (94), sah man zum Zeitpunkt 15 Tage nach Laserkoagulation eine gleichmäßige Färbung mit anti-GFAP. Bei den Männchen zeigte die Färbung ein deutliches Signal, hier war das Protein bis zur OPL erkennbar (Abbildung 9a). Die Weibchen wiesen eine GFAP-Expression dagegen nur bis zur GCL auf (Abbildung 9b). Zur Analyse wurde die Integrierte Dichte, einer Formel in der Fiji Software zur Ermittlung der Summe aller Pixelwerte im Bild, angewandt. Männchen verzeichneten eine signifikant größere anti-GFAP-Intensität als Weibchen [1802  $\mu\text{m}^2$  (M) vs. 1266  $\mu\text{m}^2$  (W), n (W/M) = 5/6, t(9)= -2,3, p= 0,04] (Abbildung 9d).

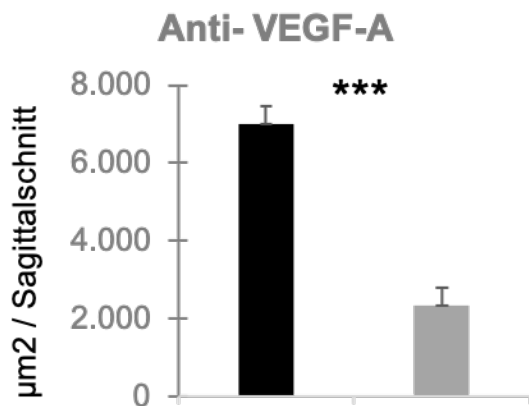
a)



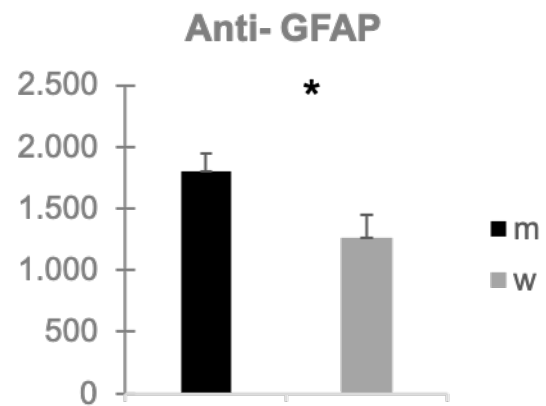
b)



c)



d)



**Abbildung 9.** Färbung mit anti-VEGF-A und anti-GFAP.

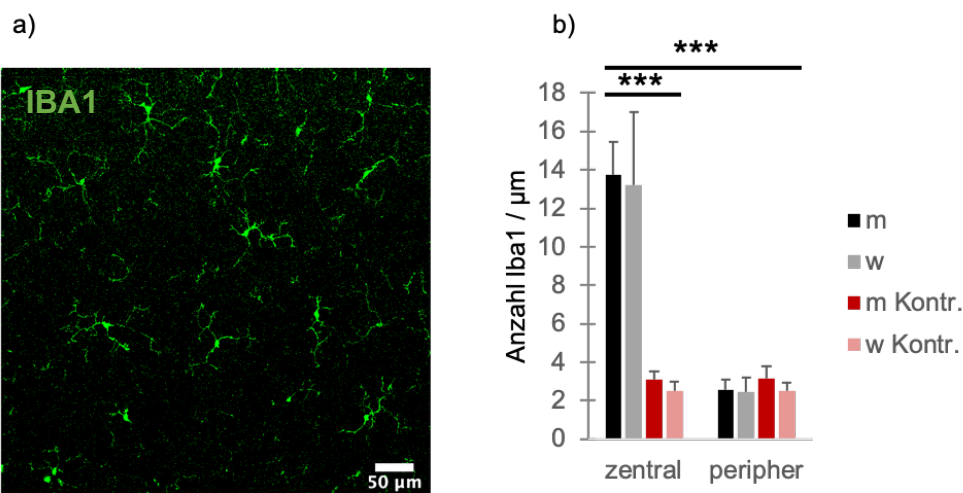
15 Tage nach Laserkoagulation präsentierten sich die Männchen (a) und Weibchen (b) folgendermaßen hinsichtlich ihrer Expression von VEGF-A (grün) und GFAP (rot): Männchen verzeichneten sowohl subretinal ein signifikant stärkeres Signal an anti-VEGF-A (c), als auch in der GCL eine deutlichere Aktivierung von Astrozyten (anti-GFAP-Signal, d). Vier Retinasagittalschnitte pro Tier wurden am Axio Imager M2 untersucht und hinsichtlich der Integrierten Dichte (mittlerer Grauwert x Bildfläche;  $\mu\text{m}^2$ ) ausgewertet. (n (W/M) = 5/6). Quelle: Eigene Darstellung.

GCL=Ganglienzellschicht, IPL= innere plexiforme Schicht, INL= innere Körnerschicht, ONL= äußere Körnerschicht, OS= Außensegmente der Photorezeptoren.

## 8.4 Dichte der Mikroglia

Bei der immunhistologischen Färbung der retinalen Flachpräparate gegen P2RY12 (Purinerge Protein-G-gekoppelter Rezeptor P2Y12), ein bei aktivierten Mikroglia exprimiertes Oberflächenprotein und Signalmolekül für eine Chemotaxis (95, 96), sah man sowohl zentral als auch peripher ein recht schwaches Signal 15 Tage nach Laserkoagulation. Im direkten Vergleich der P2RY12-

positiven Anzahl aktivierter Mikroglia im Bereich um den Nervus opticus mit derjenigen in der Peripherie zeigte sich kein signifikanter Unterschied [3 Zellen/ $\mu\text{m}$  zentral vs. 3 Zellen/ $\mu\text{m}$  peripher,  $n=17$ ,  $p=0,13$ ]. Gegenüber den Kontrolltieren verzeichneten die gelaserten Tiere hier keine größere Mikroglia-dichte, sowohl zentral [3 Zellen/ $\mu\text{m}$  Laser vs 3 Zellen/ $\mu\text{m}$  Kontrolle,  $n(\text{Laser})=10$ ,  $n(\text{Kontrolle})=7$ ,  $p=0,85$ ] als auch peripher [2 Zellen/ $\mu\text{m}$  Laser vs. 3 Zellen/ $\mu\text{m}$  Kontrolle,  $n(\text{Laser})=10$ ,  $n(\text{Kontrolle})=7$ ,  $p=0,09$ ]. Männchen und Weibchen wiesen an beiden Orten die gleiche Anzahl aktivierter Mikroglia in der Retina auf [Sehnerv: 3 Zellen/ $\mu\text{m}$  (M) vs. 3 Zellen/ $\mu\text{m}$  (W), Peripherie: 2 Zellen/ $\mu\text{m}$  (M) vs. 2 Zellen/ $\mu\text{m}$  (W),  $n(W/M)=7/10$ ,  $p=0,75$  zentral und  $p=0,5$  peripher]. Dabei präsentierten sich die Mikroglia in der Retina morphologisch in einer ramifizierten Form.



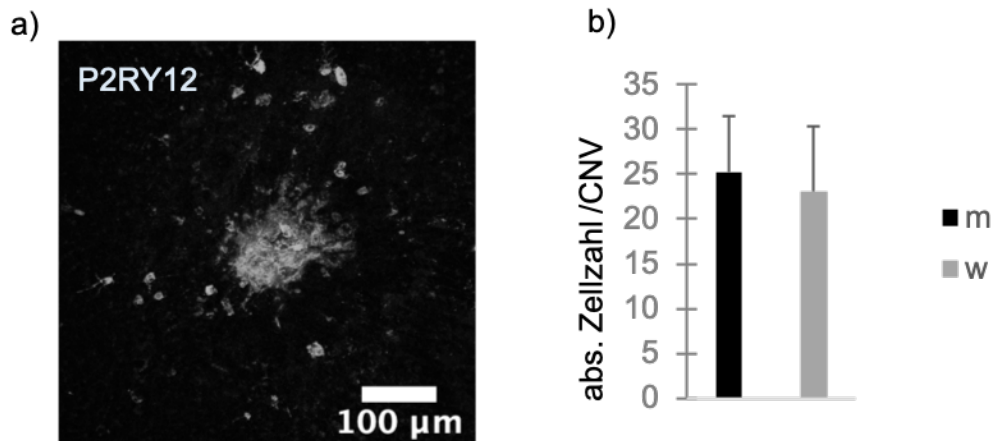
**Abbildung 10.** Iba1-positive Zellen in der Retina.

Repräsentative Aufnahme der Anti-Iba1-Färbung von retinalen Flachpräparaten, untersucht am Leica TCS SPE Konfokalmikroskop, (b) Sowohl um den Nervus opticus, als auch in der Peripherie der Retina sah man keinen Unterschied in der Aktivierung der Mikroglia/Makrophagen zwischen Männchen und Weibchen. Allerdings war die Mikroglia-dichte pro  $\mu\text{m}^2$  zentral signifikant höher als peripher und höher bei den gelaserten im Vergleich zu ungelaserten Tieren ( $p < 0,001$ ,  $n(W/M) = 7/10$ ). Quelle: Eigene Darstellung.

Darüber hinaus wurden die retinalen Flachpräparate zusätzlich gegen Iba1 (ionisiertes Calcium-bindendes Adaptermolekül 1) gefärbt, ein für Mikroglia- und Makrophagen spezifisches Protein mit Beteiligung an der Phagozytose (97). Sowohl peripher als auch zentral zeigte sich ein stärkeres Signal als bei der Färbung mit anti-P2RY12, sodass insgesamt eine höhere Zelldichte analysiert werden konnte. Auch hier konnte kein Geschlechtsunterschied in der Iba1-positiven Anzahl an Zellen nachgewiesen werden [Sehnerv: 8 Zellen/ $\mu\text{m}^2$  (M) vs. 13 Zellen/ $\mu\text{m}^2$  (W), Peripherie: 3 Zellen/ $\mu\text{m}^2$  (M) vs. 2 Zellen/ $\mu\text{m}^2$  (W),  $n(W/M) = 7/10$ ,  $p=0,21$  zentral und  $p=0,88$  peripher] (Abbildung 10b). Die Dichte an Iba1-positiven Zellen war jedoch im Bereich um den Sehnervkopf

mit durchschnittlich  $10 \pm 2$  Zellen / $\mu\text{m}$  größer als in der Peripherie der Retina mit durchschnittlich  $3 \pm 0$  Zellen / $\mu\text{m}$  [  $n=17$ ,  $p < 0,001$ ] (Abbildung 10b). Ferner existierte eine höhere Iba1-Expression bei gelaserten Tieren im Zentrum [ 15 Zellen/ $\mu\text{m}$  Laser vs. 3 Zellen/ $\mu\text{m}$  Kontrolle,  $n$  (Kontrolle) = 7,  $n$ (Laser)= 10,  $p < 0,001$ ](Abbildung 10b), in der Peripherie war die Zelldichte im Vergleich zu den Kontrollen jedoch ähnlich [2 Zellen/ $\mu\text{m}$  Laser vs. 3 Zellen/ $\mu\text{m}$  Kontrolle,  $n$  (Kontrolle) = 7,  $n$ (Laser)= 10,  $p = 0,27$  ].

Auf den choroidalen Flachpräparaten wurde die Anzahl P2R12-positiver Zellen im Bereich der CNV analysiert (Abbildung 11). Hierbei konnten durchschnittlich  $25 \pm 6$  Zellen bei den Männchen und  $23 \pm 7$  bei den Weibchen erfasst werden, womit sich kein Unterschied in der Anzahl aktivierter Mikroglia im lokalen Bereich der Inflammation ergab [  $n(W/M) = 4/7$ ,  $p = 0,74$ ] (Abbildung 11b). Morphologisch stellten sich die markierten Zellen in einer amöboiden Form dar.



**Abbildung 11.** P2YR12-positive Zellen um laserinduzierte CNV auf choroidalen Flachpräparaten.

**a)** Repräsentatives Bild, untersucht am Leica TCS SPE Konfokalmikroskop. Die CNV ist zentral ebenfalls bei P2YR12-positiver Zellakkumulation gegengefärbt. **b)** Quantifizierung der P2YR12-positiven Zellen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Geschlechtern 15 Tage nach Laserkoagulation ( $n(W/M) = 4/7$ ). Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Quelle: Eigene Darstellung.

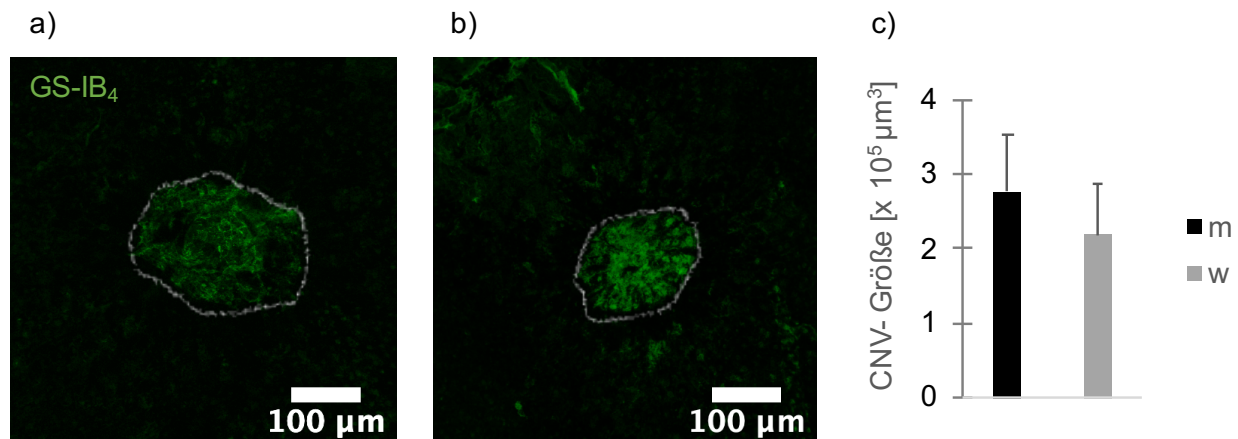
## 8.5 Quantifizierung der CNV

Choroidale Flachpräparate wurden 15 Tage nach Laserkoagulation mit Anti-CD 102 und Isolectin GS-IB<sub>4</sub> gefärbt, um die Größe der laserinduzierte CNV in Abhängigkeit des Geschlechts zu ermitteln und zu vergleichen.

Die CNV konnte hierbei mittels Isolectin GS-IB<sub>4</sub>, einem Glykoprotein der Lectin-Gruppe und spezifischem Marker von Endothelzellen sowie murinen Makrophagen und Mikroglia, positiv dargestellt werden (Abbildung 12 ab)(98, 99). Zum Zeitpunkt 15 Tage verhielt sich das mittlere CNV-

Volumen pro Laserherd zwischen den Männchen und Weibchen ähnlich [2,7 (M) vs. 2,1 (W) x 10<sup>5</sup> μm<sup>3</sup>, n(W/M) = 4/7, p= 0, 98] (Abbildung 12c).

Desweiteren war es geplant, das Volumen mittels Anti- CD102, einem Antikörper mit spezifischer Bindung an das Oberflächenprotein CD102/ ICAM-2 auf Endothelzellen und Leukozyten, co zu färben(100). Die CD102-Bindung war allerdings unspezifisch und die Färbung daher methodisch bedingt negativ.



**Abbildung 12.** Färbung der laserinduzierten CNV mit Isolectin GS-IB<sub>4</sub>.

**a)** Darstellung der Fläche einer CNV auf einem choroidalen Flachpräparat, welche zusammen mit der Höhe (hier nicht dargestellt) als CNV-Volumen analysiert wurde. In dieser Aufnahme wird die repräsentative Fläche eines Männchens gezeigt. **b)** Repräsentative CNV eines Weibchens. **c)** Das entstandene Volumen 15 Tage nach Laserapplikation unterschied sich nicht zwischen den Geschlechtern (n(W/M) = 4/7). Quelle: Eigene Darstellung.

## 9 Diskussion

### 9.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Pathologie und vor allem die Immunreaktion der laserinduzierten CNV erstmals systematisch geschlechtsspezifisch analysiert. Für die Untersuchung wurden umfangreiche klinische Bildgebungsverfahren sowie immunhistologische Methoden zur geschlechtssensiblen Detektion der Mikroglia-dichte und Angiogenese eingesetzt.

In der Bildgebung konnte die unterschiedliche Ausprägung der Pathologie nachgewiesen werden. In der FA zeigte sich eine deutliche Gefäßleckage pro Laserherd und in der BAF fokal autofluoreszierendes Material, welches im Bereich des Laserherds zur Fläche konfluierte. In der IR zeigte sich dort, wo der Laserstrahl die Netzhaut passierte, ein hyporeflektiven Gewebeschaden. In der OCT konnten 7 Tage nach Laserkoagulation retinale Veränderungen beobachtet werden, die von

hyperreflektivem Material intraretinal und leichten serösen Abhebungen mit subretinalen Flüssigkeitseinlagerungen reichten. 14 Tage nach Laserkoagulation waren diese Veränderungen nicht mehr sichtbar, stattdessen aber eine verringerte Retinaschichtdicke und Atrophie im Bereich des Laserherdes. Ein signifikanter, geschlechtsspezifischer Unterschied war 7 Tage nach Laserkoagulation in der BAF erkennbar, wobei Männchen eine größere Autofluoreszenz als Weibchen aufwiesen. In den anderen Bildgebungsmodalitäten differierten die einzelnen Pathologieausprägungen zwischen dem Geschlecht nicht. Es zeigte sich ferner keine signifikante Befundveränderung im Zeitverlauf (BAF, FA, IR).

Retinasagittalschnitte wurden hinsichtlich einer GFAP- und VEGF-A-Expression untersucht. Eine deutlichere Gliose (GFAP) und Angiogenese (VEGF-A) zeigte sich bei den Männchen 15 Tage nach Laserkoagulation.

Auf den retinalen Flachpräparaten ließ sich sowohl für die anti-Iba1-, als auch für die anti-P2YR12-Färbung kein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Mikroglia-dichte 15 Tage nach Setzen des Inflammationsreizes feststellen. Allerdings befanden sich mehr Iba-1-positive Zellen im Bereich um den Nervus opticus als in der peripheren Retina. Ferner verzeichneten gelaserte Tiere zentral mehr Zellen als ungelaserte Tiere.

Das laserinduzierte CNV-Volumen, welches auf choroidalen Flatmounts mittels Isolectin-Färbung analysiert wurde, zeigte keinen Unterschied in der Größenbildung zwischen Männchen und Weibchen zum untersuchten Zeitpunkt (15 Tage). Eine scheinbare Mikrogliose zur CNV konnte beobachtet werden, hierbei präsentierten sich die Zellen rund und amöboidartig. Die Anzahl dieser Zellen differierte nicht im Geschlechtervergleich.

## **9.2 Diskussion der Methodik**

### *9.2.1 Laserkoagulation*

Das Tiermodell der laserinduzierten CNV wurde bereits zahlreich angewandt, um Mechanismen und mögliche Therapien der exsudativen AMD zu untersuchen.

Um choroidale Neovaskularisationen zu entwickeln, erhielten die Mäuse insgesamt vier Laserherde pro Retina, möglichst um den Sehnervkopf mit einem Laserherd pro Netzhaut-Quadrant. Dabei wurden die Einstellungen am Laser (120 mW Energie, 50 µm Durchmesser, 100 ms Dauer) gewählt, die in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe bereits validiert wurden (101, 102, 103, 104, 105).

Eine Limitation in dieser Arbeit ist, dass die Tiere von zwei Personen mit unterschiedlich langer Erfahrung in der Laserkoagulation behandelt wurden. So mussten Daten mit konfluierenden Laserherden ausgeschlossen werden, sodass letztlich eine ungleiche Anzahl an Männchen und Weibchen zur geschlechtsspezifischen Analyse zur Verfügung stand.

Gong et al. und Shah et al. deklarierten ebenfalls in ihren Studien, dass das Lasern an einem Spaltlampensystem, wie in dieser Arbeit, mit Schwierigkeiten verbunden ist, da die Technik zunächst erlernt werden muss (106, 107). Das Tiermodell gelte zwar als robust, allerdings sind die laserinduzierte CNV und die damit verbundene Gefäßleckage von der Qualität und Lokalisation der Laserkoagulation und vom Winkel des Laserstrahls abhängig (106). Daher verfassten sie ein Protokoll zur standardisierten Durchführung des Tiermodells, Gong et al. verwendeten hierfür ein Lasersystem speziell für Nagetiere (Micron IV, Phoenix).

Poor et al. untersuchten die Fläche der laserinduzierte CNV auf choroidalen Flachpräparaten in Abhängigkeit der Laserbediener. Die durchschnittliche Größe der CNV differierte hierbei nicht zwischen den untersuchten Wissenschaftlern, wobei es 8-41 Versuchsdurchläufe pro Person gab (108).

Um valide Ergebnisse mit einem ausreichenden Messniveau für die geschlechtsspezifische Untersuchung der laserinduzierten CNV zu erhalten, sind daher Wiederholungsexperimente nötig. Diese wurden nach dem Abschluss meiner Arbeit bereits innerhalb der Arbeitsgruppe durchgeführt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Laserkoagulation einheitlich um den Sehnervkopf mit einem Laserspot pro Quadranten und gleicher Distanz zueinander erfolgte. Die Ergebnisse aus diesen Wiederholungsexperimenten unterscheiden sich teilweise von meinen Ergebnissen. Dies zeigt, wie wichtig standardisierte Methoden einerseits und der Ausbildungsstand der Personen sind, die die Experimente durchführen. Die nach den Wiederholungsexperimenten erlangten Daten sind robust und valide. Ich habe diese zum Vergleich in Kapitel 9.3.3 zusammengefasst.

### *9.2.2 Quantifizierung der Pathologie mittels Bildgebung*

In der vorliegenden Arbeit wurden umfangreiche Bildgebungsparameter eingesetzt, um die inflammatorische Reaktion mit ihren verschiedenen Ausprägungen nach der Laserkoagulation systematisch und geschlechtsspezifisch zu analysieren.

Hierzu wurde der automatisch angegebene Maßstab durch die Heidelberg Eye Explorer Software verwendet, um die zunächst unkalibrierten Bilder nach Öffnen in der Fiji Software (Pixel x Pixel) nach realen Maßen in  $\mu\text{m}^2 \times \mu\text{m}^2$  zu skalieren. Nach Rücksprache mit dem Kleintiermanagement der Heidelberg Eye Explorer Software wurde bekannt, dass der automatische Maßstab bezüglich

seiner horizontalen Angabe jedoch auf Annahmen des Gullstrandschen Augenmodells (vereinfachtes menschliches Modellauge mit durchschnittlichen Refraktionswerten) sowie auf den eingestellten Hornhautradialradius und Fokus beruht. Eine Problematik bei der Aufnahme des Mäusefundus ist hierbei, dass kleine Änderungen der z-Position der Kamera große Auswirkungen auf die Bildvergrößerung haben (109).

Denkbar wäre daher für zukünftige Bildgebungsaufnahmen, auf einen korrekt eingestellten Fokus zu achten und den Hornhautradialradius entsprechend für Mäuse anzupassen, um die Skalierung der Heidelberg Eye Explorer Software verwenden zu können. Eine Alternative wäre die Quantifizierung der verschiedenen Parameter mittels Pixelanzahl.

### 9.2.3 *Immunhistochemische Färbung der Retinasagittalschnitte*

Zur mikroskopischen Analyse einer geschlechtsspezifischen Gliose und Angiogenese in der Retina nach Laserkoagulation wurden die Antikörper anti-GFAP und anti-VEGF-A verwendet.

Das Prinzip der immunhistochemischen Untersuchung ist es, einen Antikörper an ein bestimmtes Zellantigen in Form einer Primärreaktion zu binden, um es dann durch eine Sekundärreaktion sichtbar zu machen.

Die beiden genannten polyklonalen Antikörper wurden vor der Färbung mit ihren jeweiligen Herstellerangaben und Publikationen verglichen und im Labor auf ihre Qualität und Eignung überprüft (93, 94, 103, 110). Problematisch beim Färben mit polyklonalen Antikörpern ist allerdings, dass sie für Kreuzreaktionen und falsch positive Färbungen anfällig sind, bedingt durch ihre Bindungskapazität an verschiedene Epitope des Antigens (111). Eine weitere Schwierigkeit kann eine unspezifische Hintergrundfärbung durch die Sekundärantikörper sein (112, 113). In der vorliegenden Arbeit ließ sich in der Färbung mit anti-VEGF-A lediglich eine Färbung der retinalen Außensegmente erkennen, denn auf den gefertigten Retinasagittalschnitten 15 Tage nach Laserkoagulation war keine CNV oder eine Wundheilungsreaktion lokalisierbar.

Für die Primärreaktion muss jedoch das Antigen vorhanden sein. Ein Verlust ist möglicherweise die Folge des Schneidens der in Paraffin eingebetteten Augen. Lambert et al. schlussfolgerten ebenfalls in ihrem angefertigten Protokoll, dass eine fehlende CNV auf histologischen Schnitten entweder durch eine zu hohe Laserenergie oder durch das Schneiden, hier mittels Kryostat, bedingt ist (114). In anderen Studien konnte bei gelaserten Tieren im Bereich der CNV ein intensives VEGF-A-Signal im subretinalen Raum, in der Choroidea, im RPE, in den Photorezeptoren sowie verteilt intraretinal nachgewiesen werden, keines jedoch in der peripheren Retina (103, 115, 116, 117). Die Färbung mit anti-VEGF-A im CNV-Bereich gelang in diesen Studien jedoch mit einer



anderen Fixierung (Davidson-Lösung (103)), einer anderen Einbettung (Kryotechnik, (115, 117)) oder Lasermikrodissektion (117).

In Zukunft sollte daher das Färbeprotokoll optimiert werden. So könnte zunächst die Fixierung geändert werden, beispielsweise mittels 4%- PFA als Perfusionsfixierung oder mittels Davidson-Lösung (118). Ein Einbetten mittels Kryotechnik würde ferner Schrumpfungen des Gewebes und eine notwendige Antigendemaskierung vermeiden (113).

Eine andere Möglichkeit wäre, den Fokus der geschlechtsspezifischen Untersuchung auf Gliazellen zu setzen, da eine reaktive Gliose bei einem retinalem Gewebsschaden einsetzt und diese an der intraretinalen VEGF-A-Expression beteiligt sind (116, 119). In Wiederholungsexperimenten der Arbeitsgruppe wurde anti-VEGF-A daher durch Anti-Vimentin ersetzt (vergleiche die Ergebnisse in Kapitel 9.3.2).

#### *9.2.4 Immunhistochemische Färbung der Flachpräparate*

Retinale und Choroidale Flachpräparate wurden 15 Tage nach Laserkoagulation gegen Iba1, P2YR12, Isolectin GS-IB<sub>4</sub> sowie CD102 gefärbt, um die Verteilung residenter Mikroglia, die Migration zum Gewebeschaden und die Größe der entstandenen CNV geschlechtsspezifisch zu analysieren.

Zur Erhebung der Mikrogliaichte wurden auf den retinalen Flachpräparaten eine Aufnahme zentral um den Sehnervkopf und vier Aufnahmen peripher jeweils pro Kleeblatt gefertigt, sodass eine Migration im Vergleich zur nicht-gelaserten Kontrolle untersucht werden konnte. Als Marker wurden hierbei die polyklonalen Antikörper anti-Iba1 und anti-P2YR12 verwendet, welche beide zuvor im Labor und anhand von Publikationen auf ihre Qualität und Eignung überprüft wurden (95, 96, 97, 103, 104). Es wurde erstmals im Tiermodell der laserinduzierten CNV eine immunhistochemische Färbung gegen P2YR12 auf Flachpräparaten zur Erhebung der Mikrogliaichte durchgeführt. Dieser purinerge Rezeptor wird von Mikroglia-Zellen des Zentralen Nervensystems und der Retina exprimiert, wobei noch wenig über die Aktivierung in der Retina bekannt ist (120). Li et al. stellten in ihrer Studie bereits mittels immunhistochemischer Färbung und quantitativer real-time PCR fest, dass die Expression von P2-Rezeptoren nach Laserkoagulation stimuliert wird und dass diese 4 Tage nach Laserkoagulation am höchsten ist (120).

Gerade zentral um den Sehnervkopf gestaltete sich die immunhistochemische Färbung jedoch schwierig, bedingt durch die Anfälligkeit für Gewebeschäden und die Schichtdickengröße. So ließ sich in der Färbung mit anti-Iba1 eine unspezifische Färbung von Ganglienzellen und Zellen der

INL erkennen. Auch die Färbung mit anti-P2YR12 war unspezifisch und wies eine hohe Hintergrundfärbung auf. Insgesamt ergab sich ein zu geringer Umfang an Messdaten, bedingt durch den Verlust durch konfluierende Laserherde (s. Laserkoagulation), die Präparation und die Färbung.

Li et al. untersuchten die Iba1- und P2YR12-Expression immunhistochemisch anhand von Gefrierschnitten und verwendeten hierfür primäre Antikörper anderer Hersteller in einer veränderten Verdünnung (120).

Balser et al. ermittelten die Mikroglia-dichte im Laserspot auf retinalen und choroidalen Flachpräparaten mittels anti-Iba1-Färbung 3 und 7 Tage nach Laserkoagulation. Genau wie bei Luckoff et al., welche ein Protokoll zur Färbung retinaler Flachpräparate mit anti-Iba1 verfassten, wurde das Gewebe insgesamt kürzer fixiert, über Nacht permeabilisiert und Antikörper von anderen Herstellern verwendet.

Für die zukünftige Quantifizierung der residenten Mikroglia auf retinalen Flachpräparaten sollte daher ebenfalls das Färbeprotokoll der vorliegenden Arbeit optimiert werden. Die Etablierung gelang in der Arbeitsgruppe durch eine rasche Färbung nach Gewebeverarbeitung (Aufbewahrung in Methanol für maximal 2 Tage), Veränderung der Zusammensetzung des Blocking Buffers (10% Donkey Serum + 1% Triton-X-100) und Austausch in einen monoklonalen anti-Iba1-Antikörper. Ferner wurde nur eine repräsentative Aufnahme in der Peripherie der Retina gebildet.

Auf den choroidalen Flachpräparaten wurde die induzierte CNV gegen Isolectin GS-IB4 und CD102 gefärbt und ihr Volumen geschlechtsspezifisch verglichen. Ferner wurde eine Quantifizierung der P2YR12-positiven Zellen im subretinalen Raum um die CNV vorgenommen. Hierdurch sollte gezeigt werden, dass eine Migration und Akkumulation von Mikroglia zum Gewebeschaden erfolgt und dass diese sich geschlechtsspezifisch unterscheidet. Allerdings war hier die Färbung mit anti-P2YR12 ebenso unspezifisch wie auf den retinalen Flachpräparaten. Die Lectin-Färbung wurde bereits zahlreich durchgeführt und gelang auch in dieser Arbeit. Zusätzlich wurde versucht, die Größe des CNV-Volumens mittels Co-Färbung gegen CD102 zu untermauern. Diese Färbung gelang allerdings nicht. Erklären ließe sich dieses Ergebnis durch die Verwendung von monoklonalen Antikörpern, welche sehr anfällig für Epitopmodifikationen beispielsweise durch ein nicht kompatibles Fixiermedium sind (111, 118). Denkbar wäre daher der Austausch mit polyklonalen Antikörpern.

### 9.2.5 Experimentelles Design

In der vorliegenden Arbeit wurden 8 Wochen alte C57/B16- Wildtyp-Mäuse gelasert, um die entstandene Pathologie 7 und 14 Tage später geschlechtsspezifisch zu untersuchen.

6 - 8 Wochen alte Wildtyp-Mäuse sind am praktikabelsten für das Modell der laserinduzierten CNV (106, 114). Es ist jedoch gezeigt worden, dass ältere Mäuse eine größere CNV entwickeln als junge, eher gesunde Mäuse (106, 121, 122). Altersbezogene systemische Faktoren werden hierfür verantwortlich gemacht, die bisher weder im Mausmodell noch in der humanen AMD vollständig identifiziert wurden (122).

Um einen größeren translationalen Ansatz zur Erforschung der Pathogenese der exsudativen AMD zu erzielen, wäre es daher in Zukunft sinnvoll, den Einfluss des Alters einzubeziehen und die Geschlechtsspezifität systematisch an älteren Tieren zu untersuchen.

Die Zeitpunkte 7 und 14 Tage sind im Tiermodell zur Untersuchung der induzierten CNV etabliert und praktikabel. In der Analyse von Li et al. wurde gezeigt, dass der jeweilige Peak der Expression von Iba1 und P2YR12 bei 4 Tagen nach Laserkoagulation liegt und nach 7 Tagen bereits deutlich reduziert ist (120). Vorhergehende Studien erwähnten ebenfalls diesen Zeitraum als deutlichste Aktivierung von inflammatorischen Zellen, insbesondere Mikrogliazellen (114, 123, 124). Es scheint daher, dass die Aktivität der inflammatorischen Zellen in diesem Tiermodell ab 7 Tage nach Verursachen des Gewebeschadens zurückgeht, bedingt durch die einsetzende Wundheilung des Traumas. Daher könnten frühere Untersuchungszeitpunkte innerhalb von 7 Tagen nach Setzen der Laserherde im Hinblick auf die geschlechtsspezifische Immunreaktion für zukünftige Studien wichtig sein.

### **9.3 Diskussion der Ergebnisse**

#### *9.3.1 Bildgebung der Pathologie*

In der vorliegenden Arbeit wurde im Tiermodell der laserinduzierten CNV erstmalig die Geschlechtsspezifität anhand verschiedener bildgebender Module analysiert. Mit Ausnahme der höheren Autofluoreszenz der Männchen in der BAF 7 Tage nach Laserkoagulation zeigte sich kein quantifizierbarer, geschlechtsspezifischer Unterschied der Pathologie.

Die Autofluoreszenz (BAF) ist eine Technik zur Bewertung der retinalen Pigmentepithel- (RPE) und Photorezeptorfunktion. Ein erhöhter Autofluoreszenz-Wert kann auf eine Freisetzung von Lipofuszin und eine Störung des inneren/äußeren Photorezeptorenssegments nach einer akuten Verletzung sowie auf eine retinale Gliose bei verheilten Läsionen hinweisen (125). In Tiermodellen der retinalen Degeneration autofluoreszierten phagozytische Mikroglia in der in vivo Bildgebung (126, 127). Dabei schienen insbesondere diffuse Autofluoreszenz-Flecken, ähnlich wie in dieser Arbeit, durch akkumulierte Mikroglia im subretinalen Raum ausgelöst zu werden (128). Vorhergehende Studien zum Tiermodell der laserinduzierten CNV bestätigten an transgenen Mäusen,

welche Mikroglia-spezifische Fluoreszenzreporter exprimierten, dass Mikroglia nach der Laserkoagulation zunächst zum Laserherd migrieren, vor allem in der inneren Schicht der Retina aktiviert werden und sich anschließend wieder vom Laserbereich verteilen (104, 123). Darüber hinaus wurde eine Korrelation der Anzahl aktivierter Mikroglia mit der Veränderung des autofluoreszierenden Materials festgestellt (104). Denkbar ist daher, dass eine geschlechtsspezifische Aktivierung von Mikroglia für die unterschiedliche Phagozytose von geschädigten Photorezeptoren und RPE ursächlich ist.

In der OCT konnte in dieser Arbeit 7 und 14 Tage nach Laserkoagulation keine CNV-Läsion nachgewiesen werden, am ehesten bedingt durch methodische Fehler. Schnabolk et al. verglichen in ihrer Studie die Größe der CNV-Läsion in der OCT geschlechtsspezifisch. Allerdings stellten sie keinen Unterschied zwischen Männchen und Weibchen im alleinigen Modell der laserinduzierten CNV fest, jedoch bei einer zuvor induzierten systemischen Inflammation im Rahmen einer Arthritis (89). Hier wiesen Männchen eine deutliche kleinere CNV bei insgesamt reduzierter CNV-Größe auf (89). Schnabolk et al. machten die erhöhte Cxcl9-Expression hierfür verantwortlich, ein Ligand des Interferon-induzierbaren CXC-Chemokinrezeptors 3 (CXCR3) mit unter anderem angiostatischer Wirkung (89).

Auch wenn die Änderung der Autofluoreszenz sowie die Ergebnisse aus anderen Studien geringfügig sind, liefern sie Hinweise auf geschlechtsspezifische Unterschiede in der Entzündungsreaktion. Diese gilt es pathophysiologisch auf molekularer Ebene weiter zu untersuchen.

### 9.3.2 *GFAP- und VEGF-A- Expression*

In der vorliegenden Arbeit wurden die Expression von GFAP als Hinweis für eine reaktive Gliose von Astrozyten sowie die VEGF-A- Expression erstmalig im Tiermodell der laserinduzierten CNV geschlechtsspezifisch untersucht.

Immunhistologisch konnte in dieser Arbeit eine deutlichere Gliose bei den Männchen 15 Tage nach Laserkoagulation gezeigt werden. Bei den Männchen reichte die GFAP-Expression hierbei bis zur OPL mit einer Astrozytose und leichten Aktivierung der Müllerzellen. Bei den Weibchen war GFAP lediglich in der GCL der Retina exprimiert, was auf eine Astrozytose ohne Müllerzellaktivierung schließen lässt.

Eine Wiederholungsfärbung mit anti-GFAP und anti-Vimentin innerhalb der Arbeitsgruppe sollte methodische Limitationen dieser Arbeit beheben und den alleinigen Fokus auf die Reaktion von Gliazellen nach Laserkoagulation legen. Gegensätzlich zum Ergebnis dieser Arbeit zeigte sich eine leicht stärkere reaktive Gliose der Weibchen mit einer höheren GFAP-Expression nach 14 Tagen,

welche sich ebenfalls auf die Astrozyten beschränkte (Abbildung 13ab). Die Vimentin-Expression reichte von den inneren - bis zu den äußeren Retinaschichten der OPL und stellte daher die reaktive Gliose der Astrozyten und Müllerzellen sowie zusätzliche Zellen der OPL dar, welche morphologisch und bezüglich ihrer Lokalisation mit Mikroglia übereinstimmen könnten. Dieses Signal wies jedoch keinen geschlechtsspezifischen Unterschied auf (Abbildung 13ac).

In der Wiederholungsfärbung konnte zusätzlich eine Aktivitätszunahme der Makroglia im Zeitverlauf bestätigt werden (Abbildung 13bc), womit diese langfristiger zu reagieren scheinen als Mikroglia mit einem Aktivitätspeak nach 4 Tagen im laserinduzierten CNV-Modell (120, 123, 124). Dieses Ergebnis korreliert mit der Aussage von Chen et al., nach dem die astrozytäre Reaktion nach der mikroglialen Reaktion auftritt und durch diese ausgelöst wird (129). Pekny et al. vermuten eine bidirektionale Beziehung zwischen der Aktivierung von Astrozyten und der Rekrutierung von Mikroglia und Monozyten (130).

Geschlechtsspezifische Studien zu Astrozyten wurden bisher vor allem im Kontext neurologischer Erkrankungen produziert. Es konnte belegt werden, dass zerebrale Astrozyten in ihrer Proliferation durch Östrogene entzündungshemmend beeinflusst werden (131, 132), Östrogen- und Androgen-Rezeptoren tragen und selbst Neurosteroiden wie Östradiol, Progesteron und Testosteron synthetisieren (131, 132, 133, 134). Astrozyten von neugeborenen Tieren, die mit Lipopolysaccharid (LPS) behandelt wurden, zeigten bei männlichen Astrozyten einen signifikant größeren Anstieg der Entzündungsmarker als bei weiblichen, was wiederum auf den entzündungshemmenden Einfluss des Östrogens zurückgeführt wird (131, 135, 136). Ferner ist bekannt, dass die zerebrale GFAP-Expression zyklusabhängig variiert, sodass die weibliche Expression in der Follikelphase die männliche übersteigt (137, 138).

Trotta et al. wiesen in ihrer ophthalmologischen Studie zur Bedeutung von Resolvin D1 (RvD1, ein entzündungshemmender Lipidmediator) in der alters- und geschlechtsabhängigen Retina eine stärkere Astrozyten – und Mikrogliaaktivierung sowie Neuroinflammation bei 24 Monate alten männlichen Mäusen im Vergleich zu alten Weibchen nach (139). In jüngeren Mäusen zeigte sich kein geschlechtsspezifischer Unterschied. Sie deuteten den stärker reduzierten RvD1-Spiegel in der Retina der alten Männchen als Ursache für den Unterschied (139).

Zusammenfassend ist es daher wahrscheinlich, dass Astrozyten der Retina ebenfalls in ihrer inflammatorischen Reaktion durch Sexualsteroidhormone moduliert werden, wobei die GFAP-Expression bei Weibchen möglicherweise auch zyklusabhängig variieren kann. Eine geschlechtsspezifische Aktivierung von Müllerzellen lässt sich bei konträren Ergebnissen und leichtem Signal

nicht klar abgrenzen. Komponenten wie Alter und die Kommunikation mit Mikroglia scheinen weitere geschlechtsspezifische Einflüsse zu besitzen.

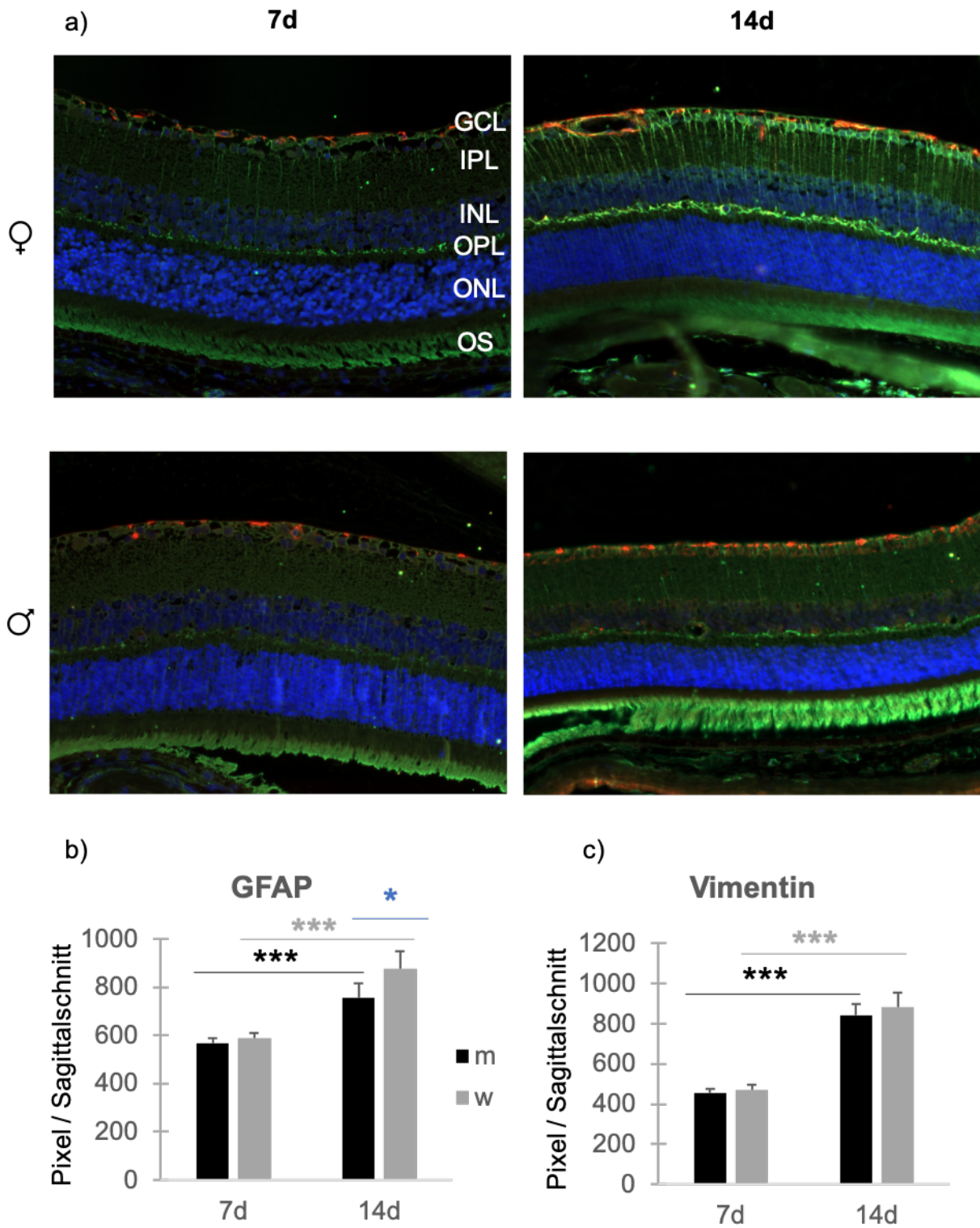


Abbildung 13. Wiederholungsexperiment der anti-GFAP-Vimentin-Färbung innerhalb der Arbeitsgruppe.

Es wurden  $n = 11$  Tiere ( $n(W/M) = 5/6$ ) zu den Zeitpunkten 7 und 14 Tage nach Laserkoagulation untersucht. Zwei Retinasagittalschnitte pro Tier wurden am Axio Imager M2 analysiert und hinsichtlich der Integrierten Dichte in Pixel ausgewertet. In **a)** sind repräsentative Bilder, Weibchen oben und Männchen unten sowie nach Zeitpunkten geordnet, für die anti-GFAP- (rot) und anti-Vimentin-Färbung (grün) dargestellt. Blau= DAPI-Färbung der Zellkerne. GFAP wurde vorwiegend in der GCL exprimiert. Vimentin ist in der GCL und OPL lokalisierbar mit Ausläufern von GCL bis OPL. **b)** Bei beiden Geschlechtern nahm die GFAP-Expression im Zeitverlauf zu, wobei diese bei den Weibchen zum Zeitpunkt 14 Tage deutlicher als bei den Männchen war. **c)** Die Vimentin-Expression nahm ebenfalls im Zeitverlauf zu, es zeigte sich hier jedoch kein geschlechtsspezifischer Unterschied. 2 way Anova,  $p^* < 0,05$ ,  $p^{***} < 0,001$ . Quelle: Eigene Darstellung.

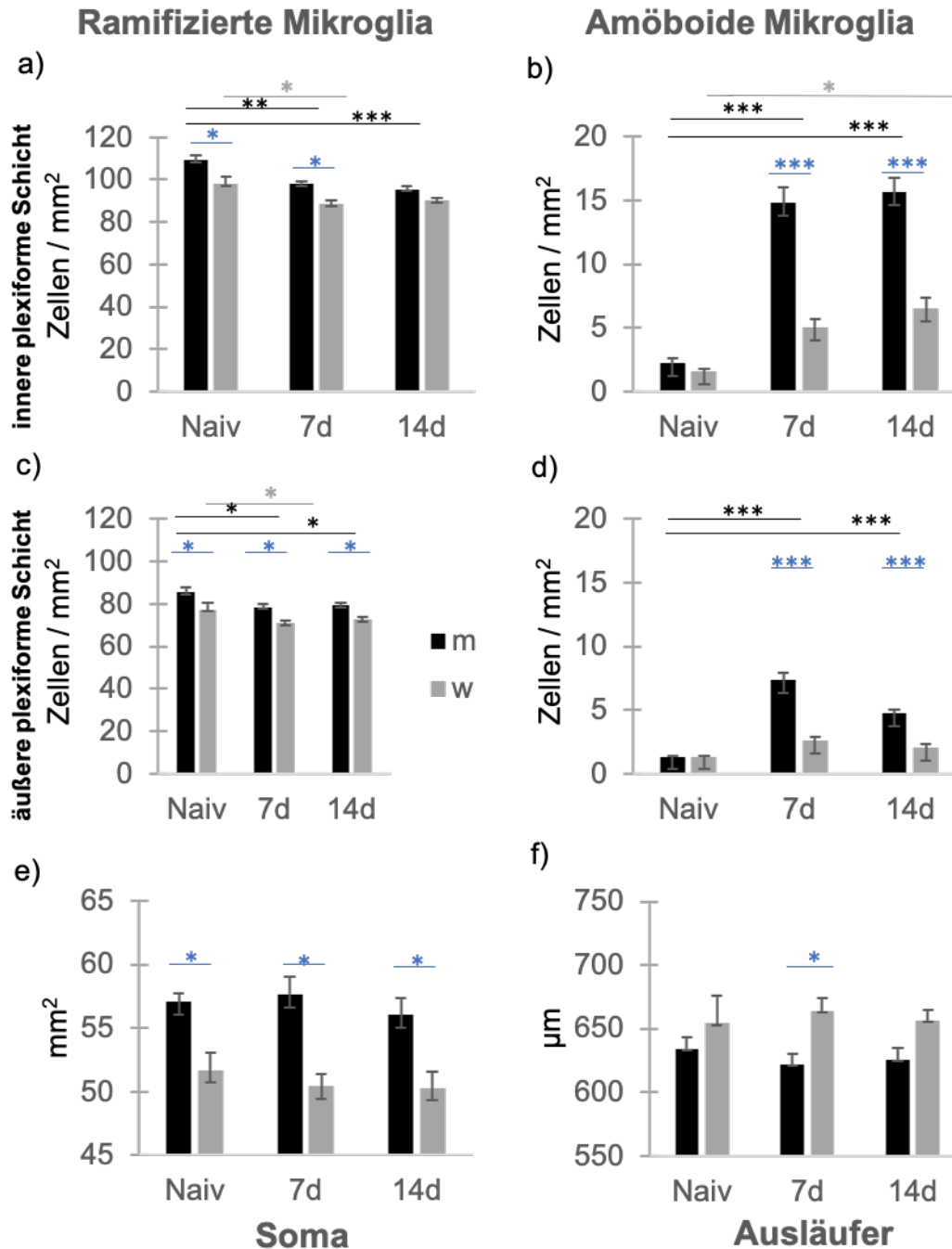
GCL=Ganglienzellschicht, IPL= innere plexiforme Schicht, INL= innere Körnerschicht, OPL= äußere plexiforme Schicht, ONL= äußere Körnerschicht, OS= Außensegmente der Photorezeptoren. 20-fache Vergrößerung.

### 9.3.3 Dichte der Mikroglia

In dieser Arbeit konnte auf retinalen Flachpräparaten zwar eine Migration residenter Mikroglia zum Ort der Laserläsionen bestätigt werden, allerdings ließ sich zum untersuchten Zeitpunkt bei beiden anti-Iba1-P2YR12-Färbungen kein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Zelldichte feststellen. Ebenso ließ sich kein Unterschied auf den choroidalen Flachpräparaten um die induzierte CNV beobachten. Aufgrund methodischer Limitationen (s. 9.2.4) sind die immunhistochemischen Ergebnisse in dieser Arbeit zur Mikroglia-dichte jedoch kritisch zu sehen.

Trotta et al. wiesen in der physiologischen Retina alter Mäuse eine höhere Anzahl Iba1-positiver Zellen und Iba1-Proteinspiegel bei den Männchen im Vergleich zu den Weibchen auf (139).

Nach Anpassung an die methodischen Fehler zeigte eine erneute Färbung mit anti-Iba1 innerhalb der Arbeitsgruppe eine höhere Zelldichte an ramifizierten Zellen bei den Männchen sowohl bei ungelaserten, als auch bei gelaserten Tieren (Abbildung 14ab). Es wurde spezifisch auf Lokalisation (IPL/OPL) und Morphologie der Mikroglia (ramifiziert/amöboid) untersucht. Der Anteil ramifizierter Zellen nahm durch den Lasereinfluss bei beiden Geschlechtern in beiden Retinaschichten ab, wohingegen die Anzahl amöboider Mikroglia in gleicher Weise zunahm, jedoch mit einer schnelleren und deutlicheren Aktivierung bei den Männchen (Abbildung 14a-d). Ungelaserte Tiere wiesen nur einen geringen Anteil amöboider Zellen auf und zeigten hier keinen geschlechtsspezifischen Unterschied in der Zelldichte (Abbildung 14bd). Außerdem ließ sich feststellen, dass die Männchen unabhängig vom Lasereinfluss im Geschlechtervergleich ein größeres Soma und Weibchen längere Ausläufer aufwiesen (Abbildung 14ef).



**Abbildung 14.** Wiederholte anti-Iba1-Färbung und Analyse zeigt geschlechtsspezifische Mikroglia-dichte und -morphologie.

Die Mikroglia-dichte von naiven Kontrolltieren und gelaserten Tieren zum Zeitpunkt 7 und 14 Tage nach Laserkoagulation wurde untersucht, hierbei wurden n=14 (n (W/M)= 7/7) Tiere für jeweils jede Gruppe verwendet. Zusätzlich wurde nach Aktivierungsgrad (ramifiziert/amöboid), Lokalisation in der Retina (IPL/OPL) und Phänotyp (Soma/Ausläufer) differenziert. **a)** In der inneren plexiformen Schicht sahen wir eine Abnahme ramifizierter Mikroglia bei gelaserten Tieren im Vergleich zur Kontrolle. Ferner zeigten Männchen in jeder Gruppe eine erhöhte Mikroglia-dichte. **b)** In der untersuchten IPL wiesen gelaserte Tiere eine höhere Mikroglia-dichte aktivierter amöboider Zellen als naive Tiere auf. Hierbei zeigte sich eine deutlich höhere Anzahl bei Männchen unabhängig vom Zeitpunkt nach Laserkoagulation. **c)** in der äußeren plexiformen Schicht konnten die gleichen Aussagen ermittelt werden wie in der inneren plexiformen Schicht. Die OPL wies jedoch insgesamt eine geringere Zelldichte auf als die IPL. **d)** Auch in der OPL konnte eine Aktivierung zur amöboiden Form von Mikrogliazellen nach Laserkoagulation bestätigt werden, bei Männchen jedoch ausgeprägter als bei Weibchen. **e)** Phänotypisch wiesen Männchen unab-



hängig von Behandlung und Zeitpunkt ein größeres Soma als Weibchen auf. **f)** Die Zellausläufer der Mikroglia waren hingegen in der Tendenz bzw statistisch signifikant bei den Weibchen länger. 3 way Anova ,  $p^* < 0,05$ ,  $p^{***} < 0,001$ . Quelle: Eigene Darstellung.

### 9.3.4 Quantifizierung der CNV

Das laserinduzierte CNV-Volumen, welches auf choroidalen Flatmounts mittels Isolectin-Färbung analysiert wurde, zeigte in dieser Arbeit keinen Unterschied in der Größenbildung zwischen Männchen und Weibchen zum untersuchten Zeitpunkt (15 Tage) und einem Tialter von 8 Wochen.

Singh et al konnten in ihrem 2021 erschienenen Abstract ebenfalls sowohl bei 8-Wochen alten, als auch einjährigen C57BL6-Mäusen keine signifikante geschlechtsabhängige CNV-Bildung und -Heilung zu den Zeitpunkten 3 bis 28 Tage nach Laser nachweisen (140). In dieser Studie wurde jedoch statt eines Argonlasers ein Diodenlaser verwendet und das laserinduzierte CNV-Volumen mittels OCT quantifiziert.

Zhu et al stellten in Ihrer Arbeit einen signifikanten Unterschied in der autofluoreszierenden CNV-Fläche 14 Tage nach Laser auf choroidalen Flatmounts fest, sowohl bei jungen (8 Wochen) als auch bei älteren (16-20 Wochen) Mäusen. Weibchen entwickelten hier eine größere Fläche als Männchen, wobei ebenfalls ein Diodenlaser verwendet wurde(121). Beachtet werden sollte hierbei, dass die ausgemessene Fläche von der Choroidea-Schnittebene abhängig ist. Sie fanden außerdem heraus, dass die mRNA-Expression von angiogenen Cytokinen wie VEGF, PlGF, Ang2 und iNOS bei gelaserten Weibchen unabhängig vom Alter im Vergleich zu Männchen höher ist und es auch bei ungelaserten älteren Kontrolltieren zu einem Geschlechtsunterschied kommt.

Wie bereits unter den Abschnitten 9.2.5 und 9.3.1. erwähnt, gibt es weitere Hinweise auf eine Geschlechtsspezifität in einem höheren Lebensalter der Mäuse sowie im Falle von Komorbidität (89, 106).

Hier gilt es Wiederholungsexperimente mit einer größeren Anzahl an Tieren sowie einer größeren Diversität, beispielsweise mit systemischen oder okulären Nebenerkrankungen und älteren Tieren, sowie andere Tiermodelle in Anlehnung der humanen Erkrankung, durchzuführen. Ferner sollten zur besseren Vergleichbarkeit der CNV standardisierte Protokolle eingehalten werden(86).

## 9.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Diese Arbeit widmet sich der Untersuchung einer geschlechtsspezifischen Antwort von Mikrogliazellen in der Pathologie der laserinduzierten Choroidalen Neovaskularisation. Die Motivation

basiert auf der bisher inkonsistenten Studienlage zur Geschlechtsspezifität bei der neurodegenerativen AMD bei bekannten geschlechtsspezifischen Unterschieden in neurodegenerativen Krankheiten wie unter anderem Alzheimer-Demenz und Parkinson. Die Arbeit stellt somit einen Beitrag zur Präzisionsmedizin dar. Mikroglia weisen als bedeutende Immuneffektorzellen des zentralen Nervensystems und der Retina mit geschlechtsspezifischen Unterschieden in Morphologie und Funktion vielversprechendes Potential auf.

Zusammenfassend konnten in Folgearbeiten geschlechtsspezifische morphologische und funktionelle Unterschiede in Mikroglia bestätigt werden. Männchen zeigten sich phänotypisch reaktiver und wiesen ein größeres Zellsoma auf. Ebenfalls wurden Hinweise auf Differenzen in der Expression von GFAP gefunden, die mit gesteigerter Gliose bei Weibchen zum Zellschutz in Verbindung stehen. Männchen wiesen eine vermehrte Fundusautofluoreszenz als Zeichen für eine gesteigerte Phagozytose auf. Jedoch ergaben die weitere Bildgebung in vivo und immunhistochemische Untersuchungen der CNV ex vivo keine Anzeichen für geschlechtsspezifische Unterschiede in der Pathologie, was mit der bisherigen Studienlage kohärent ist. Diese Arbeit bestätigt grundlagenmethodisch erstmals, dass es keine geschlechtsspezifischen Unterschiede im Wundheilungsmechanismus der laserinduzierten CNV zu geben scheint.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Einblicke spornen dazu an, die Immunantwort und Neuroinflammation der CNV bzw. exsudativen AMD genauer zu erforschen. Die Integration des Alters oder die Erwägung eines anderen CNV-Modells könnten in zukünftigen tierexperimentellen Ansätzen dazu beitragen, eine nähere Anlehnung an die humane CNV und die Pathogenese der exsudativen AMD zu erzielen. Schließlich besteht weiterer Forschungsbedarf in Bezug auf übergeordnete Regulationsmechanismen von Gliazellen, einschließlich der gonadalen und der hormonellen Achse sowie der interzellulären Kommunikation, um ein umfassendes Verständnis von ihrem Beitrag zum Krankheitsprozess zu erreichen.

## 10 Literaturverzeichnis

1. Deng Y, Qiao L, Du M, Qu C, Wan L, Li J, Huang L. Age-related macular degeneration: Epidemiology, genetics, pathophysiology, diagnosis, and targeted therapy. *Genes Dis.* 2022;9(1):62-79.
2. Fleckenstein M, Keenan TDL, Guymer RH, Chakravarthy U, Schmitz-Valckenberg S, Klaver CC, Wong WT, Chew EY. Age-related macular degeneration. *Nat Rev Dis Primers.* 2021;7(1):31.
3. Wong WL, Su X, Li X, Cheung CM, Klein R, Cheng CY, Wong TY. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health.* 2014;2(2):e106-16.
4. Gheorghe A, Mahdi L, Musat O. AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION. *Rom J Ophthalmol.* 2015;59(2):74-7.
5. Chakravarthy U, Wong TY, Fletcher A, Piau E, Evans C, Zlateva G, Buggage R, Pleil A, Mitchell P. Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *BMC Ophthalmol.* 2010;10:31.
6. Li JQ, Welchowski T, Schmid M, Mauschitz MM, Holz FG, Finger RP. Prevalence and incidence of age-related macular degeneration in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Br J Ophthalmol.* 2020;104(8):1077-84.
7. Gupta OP, Brown GC, Brown MM. Age-related macular degeneration: the costs to society and the patient. *Curr Opin Ophthalmol.* 2007;18(3):201-5.
8. Brown MM, Brown GC, Stein JD, Roth Z, Campanella J, Beauchamp GR. Age-related macular degeneration: economic burden and value-based medicine analysis. *Can J Ophthalmol.* 2005;40(3):277-87.
9. Fritsche LG, Igl W, Bailey JN, Grassmann F, Sengupta S, Bragg-Gresham JL, Burdon KP, Hebbaring SJ, Wen C, Gorski M, Kim IK, Cho D, Zack D, Souied E, Scholl HP, Bala E, Lee KE, Hunter DJ, Sardell RJ, Mitchell P, Merriam JE, Cipriani V, Hoffman JD, Schick T, Lechanteur YT, Guymer RH, Johnson MP, Jiang Y, Stanton CM, Buitendijk GH, Zhan X, Kwong AM, Boleda A, Brooks M, Gieser L, Ratnapriya R, Branham KE, Foerster JR, Heckenlively JR, Othman MI, Vote BJ, Liang HH, Souzeau E, McAllister IL, Isaacs T, Hall J, Lake S, Mackey DA, Constable IJ, Craig JE, Kitchner TE, Yang Z, Su Z, Luo H, Chen D, Ouyang H, Flagg K, Lin D, Mao G, Ferreyra H, Stark K, von Strachwitz CN, Wolf A, Brandl C, Rudolph G, Olden M, Morrison MA, Morgan DJ, Schu M, Ahn J, Silvestri G, Tsironi EE, Park KH, Farrer LA, Orlin A, Brucker A, Li M, Curcio CA, Mohand-Saïd S, Sahel JA, Audo I, Benchaboune M, Cree AJ, Rennie CA, Goverdhan SV, Grunin M, Hagbi-Levi S, Campochiaro P, Katsanis N, Holz FG, Blond F, Blanché H, Deleuze JF, Igo RP, Jr., Truitt B, Peachey NS, Meuer SM, Myers CE, Moore EL, Klein R, Hauser MA, Postel EA, Courtenay MD, Schwartz SG, Kovach JL, Scott WK, Liew G, Tan AG, Gopinath B, Merriam JC, Smith RT, Khan JC, Shahid H, Moore AT, McGrath JA, Laux R, Brantley MA, Jr., Agarwal A, Ersoy L, Caramoy A, Langmann T, Saksens NT, de Jong EK, Hoyng

- CB, Cain MS, Richardson AJ, Martin TM, Blangero J, Weeks DE, Dhillon B, van Duijn CM, Doheny KF, Romm J, Klaver CC, Hayward C, Gorin MB, Klein ML, Baird PN, den Hollander AI, Fauser S, Yates JR, Allikmets R, Wang JJ, Schaumberg DA, Klein BE, Hagstrom SA, Chowers I, Lotery AJ, L veillard T, Zhang K, Brilliant MH, Hewitt AW, Swaroop A, Chew EY, Pericak-Vance MA, DeAngelis M, Stambolian D, Haines JL, Iyengar SK, Weber BH, Abecasis GR, Heid IM. A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. *Nat Genet.* 2016;48(2):134-43.
10. Curcio CA, Johnson M, Rudolf M, Huang JD. The oil spill in ageing Bruch membrane. *Br J Ophthalmol.* 2011;95(12):1638-45.
  11. Handa JT, Bowes Rickman C, Dick AD, Gorin MB, Miller JW, Toth CA, Ueffing M, Zarbin M, Farrer LA. A systems biology approach towards understanding and treating non-neovascular age-related macular degeneration. *Nat Commun.* 2019;10(1):3347.
  12. Ramrattan RS, van der Schaft TL, Mooy CM, de Bruijn WC, Mulder PG, de Jong PT. Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994;35(6):2857-64.
  13. Mullins RF, Schoo DP, Sohn EH, Flamme-Wiese MJ, Workamelahu G, Johnston RM, Wang K, Tucker BA, Stone EM. The membrane attack complex in aging human choriocapillaris: relationship to macular degeneration and choroidal thinning. *Am J Pathol.* 2014;184(11):3142-53.
  14. Friedman E. A hemodynamic model of the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol.* 1997;124(5):677-82.
  15. Malek G, Li CM, Guidry C, Medeiros NE, Curcio CA. Apolipoprotein B in cholesterol-containing drusen and basal deposits of human eyes with age-related maculopathy. *Am J Pathol.* 2003;162(2):413-25.
  16. Jabbehdari S, Handa JT. Oxidative stress as a therapeutic target for the prevention and treatment of early age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol.* 2021;66(3):423-40.
  17. García-Onrubia L, Valent n-Bravo FJ, Coco-Martin RM, González-Sarmiento R, Pastor JC, Usategui-Martín R, Pastor-Idoate S. Matrix Metalloproteinases in Age-Related Macular Degeneration (AMD). *Int J Mol Sci.* 2020;21(16).
  18. Chen M, Xu H. Parainflammation, chronic inflammation, and age-related macular degeneration. *J Leukoc Biol.* 2015;98(5):713-25.
  19. Penfold PL, Killingsworth MC, Sarks SH. Senile macular degeneration: the involvement of immunocompetent cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1985;23(2):69-76.
  20. Anderson DH, Mullins RF, Hageman GS, Johnson LV. A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am J Ophthalmol.* 2002;134(3):411-31.
  21. Hageman GS, Luthert PJ, Victor Chong NH, Johnson LV, Anderson DH, Mullins RF. An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res.* 2001;20(6):705-32.

22. Pfau M, Möller PT, Künzel SH, von der Emde L, Lindner M, Thiele S, Dysli C, Nadal J, Schmid M, Schmitz-Valckenberg S, Holz FG, Fleckenstein M. Type 1 Choroidal Neovascularization Is Associated with Reduced Localized Progression of Atrophy in Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmol Retina*. 2020;4(3):238-48.
23. Capuano V, Miere A, Querques L, Sacconi R, Carnevali A, Amoroso F, Bandello F, Souied EH, Querques G. Treatment-Naïve Quiescent Choroidal Neovascularization in Geographic Atrophy Secondary to Nonexudative Age-Related Macular Degeneration. *Am J Ophthalmol*. 2017;182:45-55.
24. Heiferman MJ, Fawzi AA. Progression of subclinical choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *PLoS One*. 2019;14(6):e0217805.
25. Blaauwgeers HG, Holtkamp GM, Rutten H, Witmer AN, Koolwijk P, Partanen TA, Alitalo K, Kroon ME, Kijlstra A, van Hinsbergh VW, Schlingemann RO. Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *Am J Pathol*. 1999;155(2):421-8.
26. Sparrow JR, Fishkin N, Zhou J, Cai B, Jang YP, Krane S, Itagaki Y, Nakanishi K. A2E, a byproduct of the visual cycle. *Vision Res*. 2003;43(28):2983-90.
27. Ferris FL, 3rd, Wilkinson CP, Bird A, Chakravarthy U, Chew E, Csaky K, Sadda SR. Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2013;120(4):844-51.
28. Coleman HR, Chan CC, Ferris FL, 3rd, Chew EY. Age-related macular degeneration. *Lancet*. 2008;372(9652):1835-45.
29. Mokwa NF, Ristau T, Keane PA, Kirchhof B, Sadda SR, Liakopoulos S. Grading of Age-Related Macular Degeneration: Comparison between Color Fundus Photography, Fluorescein Angiography, and Spectral Domain Optical Coherence Tomography. *J Ophthalmol*. 2013;2013:385915.
30. Spaide RF, Jaffe GJ, Sarraf D, Freund KB, Sadda SR, Staurenghi G, Waheed NK, Chakravarthy U, Rosenfeld PJ, Holz FG, Souied EH, Cohen SY, Querques G, Ohno-Matsui K, Boyer D, Gaudric A, Blodi B, Baumal CR, Li X, Coscas GJ, Brucker A, Singerman L, Luthert P, Schmitz-Valckenberg S, Schmidt-Erfurth U, Grossniklaus HE, Wilson DJ, Guymer R, Yannuzzi LA, Chew EY, Csaky K, Monés JM, Pauleikhoff D, Tadayoni R, Fujimoto J. Consensus Nomenclature for Reporting Neovascular Age-Related Macular Degeneration Data: Consensus on Neovascular Age-Related Macular Degeneration Nomenclature Study Group. *Ophthalmology*. 2020;127(5):616-36.
31. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, Chisholm IH, Coscas G, Davis MD, de Jong PT, Klaver CC, Klein BE, Klein R, et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. *Surv Ophthalmol*. 1995;39(5):367-74.
32. Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, Holz FG, Wong TY. Age-related macular degeneration. *Lancet*. 2012;379(9827):1728-38.

33. Stevens GA, White RA, Flaxman SR, Price H, Jonas JB, Keeffe J, Leasher J, Naidoo K, Pesudovs K, Resnikoff S, Taylor H, Bourne RRA. Global prevalence of vision impairment and blindness: magnitude and temporal trends, 1990-2010. *Ophthalmology*. 2013;120(12):2377-84.
34. Courtright P, Lewallen S. Why are we addressing gender issues in vision loss? *Community Eye Health*. 2009;22(70):17-9.
35. Risk factors associated with age-related macular degeneration. A case-control study in the age-related eye disease study: Age-Related Eye Disease Study Report Number 3. *Ophthalmology*. 2000;107(12):2224-32.
36. Owen CG, Jarrar Z, Wormald R, Cook DG, Fletcher AE, Rudnicka AR. The estimated prevalence and incidence of late stage age related macular degeneration in the UK. *Br J Ophthalmol*. 2012;96(5):752-6.
37. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392(10159):1736-88.
38. Aninye IO, Digre K, Hartnett ME, Baldonado K, Shriver EM, Periman LM, Grutzmacher J, Clayton JA. The roles of sex and gender in women's eye health disparities in the United States. *Biol Sex Differ*. 2021;12(1):57.
39. Heesterbeek TJ, Lorés-Motta L, Hoyng CB, Lechanteur YTE, den Hollander AI. Risk factors for progression of age-related macular degeneration. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2020;40(2):140-70.
40. Chew EY, Clemons TE, Agrón E, Sperduto RD, Sangiovanni JP, Davis MD, Ferris FL, 3rd. Ten-year follow-up of age-related macular degeneration in the age-related eye disease study: AREDS report no. 36. *JAMA Ophthalmol*. 2014;132(3):272-7.
41. Jonasson F, Fisher DE, Eiriksdottir G, Sigurdsson S, Klein R, Launer LJ, Harris T, Gudnason V, Cotch MF. Five-year incidence, progression, and risk factors for age-related macular degeneration: the age, gene/environment susceptibility study. *Ophthalmology*. 2014;121(9):1766-72.
42. Lechanteur YT, van de Ven JP, Smailhodzic D, Boon CJ, Klevering BJ, Fauser S, Groenewoud JM, van der Wilt GJ, den Hollander AI, Hoyng CB. Genetic, behavioral, and sociodemographic risk factors for second eye progression in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(9):5846-52.
43. Hallak JA, de Sisternes L, Osborne A, Yaspan B, Rubin DL, Leng T. Imaging, Genetic, and Demographic Factors Associated With Conversion to Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Ophthalmol*. 2019;137(7):738-44.
44. Joachim N, Mitchell P, Burlutsky G, Kifley A, Wang JJ. The Incidence and Progression of Age-Related Macular Degeneration over 15 Years: The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*. 2015;122(12):2482-9.

45. Bek T, Klug SE. Age, sex, and type of medication predict the effect of anti-VEGF treatment on central retinal thickness in wet age-related macular degeneration. *Clin Ophthalmol.* 2018;12:473-9.
46. Pedrosa AC, Sousa T, Pinheiro-Costa J, Beato J, Falcão MS, Falcão-Reis F, Carneiro A. Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration with Anti-VEGF Agents: Predictive Factors of Long-Term Visual Outcomes. *J Ophthalmol.* 2017;2017:4263017.
47. Mitchell P, Smith W, Attebo K, Wang JJ. Prevalence of age-related maculopathy in Australia. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology.* 1995;102(10):1450-60.
48. Klein R, Klein BEK, Linton KLP. Prevalence of Age-related Maculopathy: The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology.* 2020;127(4s):S122-s32.
49. Colijn JM, Buitendijk GHS, Prokofyeva E, Alves D, Cachulo ML, Khawaja AP, Cougnard-Gregoire A, Merle BMJ, Korb C, Erke MG, Bron A, Anastasopoulos E, Meester-Smoor MA, Segato T, Piermarocchi S, de Jong P, Vingerling JR, Topouzis F, Creuzot-Garcher C, Bertelsen G, Pfeiffer N, Fletcher AE, Foster PJ, Silva R, Korobelnik JF, Delcourt C, Klaver CCW. Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in Europe: The Past and the Future. *Ophthalmology.* 2017;124(12):1753-63.
50. Erke MG, Bertelsen G, Peto T, Sjølie AK, Lindekleiv H, Njølstad I. Prevalence of age-related macular degeneration in elderly Caucasians: the Tromsø Eye Study. *Ophthalmology.* 2012;119(9):1737-43.
51. Defay R, Pinchinat S, Lumbroso S, Sutan C, Delcourt C. Sex steroids and age-related macular degeneration in older French women: the POLA study. *Ann Epidemiol.* 2004;14(3):202-8.
52. Sasaki M, Harada S, Kawasaki Y, Watanabe M, Ito H, Tanaka H, Takeuchi A, Tsubota K, Takebayashi T, Nishiwaki Y, Kawasaki R. Gender-specific association of early age-related macular degeneration with systemic and genetic factors in a Japanese population. *Sci Rep.* 2018;8(1):785.
53. Munch IC, Linneberg A, Larsen M. Precursors of age-related macular degeneration: associations with physical activity, obesity, and serum lipids in the inter99 eye study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(6):3932-40.
54. Snow KK, Cote J, Yang W, Davis NJ, Seddon JM. Association between reproductive and hormonal factors and age-related maculopathy in postmenopausal women. *Am J Ophthalmol.* 2002;134(6):842-8.
55. Attebo K, Mitchell P, Smith W. Visual acuity and the causes of visual loss in Australia. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology.* 1996;103(3):357-64.
56. Smith W, Mitchell P, Wang JJ. Gender, oestrogen, hormone replacement and age-related macular degeneration: results from the Blue Mountains Eye Study. *Aust N Z J Ophthalmol.* 1997;25 Suppl 1:S13-5.
57. Fonteh CN, Palestine AG, Wagner BD, Patnaik JL, Mathias MT, Mandava N, Baldermann R, Lynch AM. Sex Differences in RANTES (CCL5) in Patients With Intermediate Age-Related

Macular Degeneration (AMD) and Controls With no AMD. *Transl Vis Sci Technol.* 2022;11(2):12.

58. Marin AI, Poppelaars F, Wagner BD, Palestine AG, Patnaik JL, Holers VM, Frazer-Abel AA, Mathias MT, Manoharan N, Fonteh CN, Mandava N, Lynch AM. Sex and Age-Related Differences in Complement Factors Among Patients With Intermediate Age-Related Macular Degeneration. *Transl Vis Sci Technol.* 2022;11(5):22.

59. Ma Y, Ding X, Shao M, Qiu Y, Li S, Cao W, Xu G. Association of Serum Complement C1q and C3 Level with Age-Related Macular Degeneration in Women. *J Inflamm Res.* 2022;15:285-94.

60. Fraser-Bell S, Wu J, Klein R, Azen SP, Varma R. Smoking, alcohol intake, estrogen use, and age-related macular degeneration in Latinos: the Los Angeles Latino Eye Study. *Am J Ophthalmol.* 2006;141(1):79-87.

61. Vingerling JR, Dielemans I, Witteman JC, Hofman A, Grobbee DE, de Jong PT. Macular degeneration and early menopause: a case-control study. *Bmj.* 1995;310(6994):1570-1.

62. Gold SM, Willing A, Leypoldt F, Paul F, Friese MA. Sex differences in autoimmune disorders of the central nervous system. *Semin Immunopathol.* 2019;41(2):177-88.

63. Patel R, Kompolti K. Sex and Gender Differences in Parkinson's Disease. *Neurol Clin.* 2023;41(2):371-9.

64. Lee JW, Profant M, Wang C. Metabolic Sex Dimorphism of the Brain at the Gene, Cell, and Tissue Level. *J Immunol.* 2022;208(2):212-20.

65. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(10):626-38.

66. Karlstetter M, Scholz R, Rutar M, Wong WT, Provis JM, Langmann T. Retinal microglia: just bystander or target for therapy? *Prog Retin Eye Res.* 2015;45:30-57.

67. Li L, Eter N, Heiduschka P. The microglia in healthy and diseased retina. *Exp Eye Res.* 2015;136:116-30.

68. Fan W, Huang W, Chen J, Li N, Mao L, Hou S. Retinal microglia: Functions and diseases. *Immunology.* 2022;166(3):268-86.

69. Murenu E, Gerhardt MJ, Biel M, Michalakakis S. More than meets the eye: The role of microglia in healthy and diseased retina. *Front Immunol.* 2022;13:1006897.

70. Paolicelli RC, Sierra A, Stevens B, Tremblay ME, Aguzzi A, Ajami B, Amit I, Audinat E, Bechmann I, Bennett M, Bennett F, Bessis A, Biber K, Bilbo S, Blurton-Jones M, Boddeke E, Brites D, Brône B, Brown GC, Butovsky O, Carson MJ, Castellano B, Colonna M, Cowley SA, Cunningham C, Davalos D, De Jager PL, de Strooper B, Denes A, Eggen BJL, Eyo U, Galea E, Garel S, Ginhoux F, Glass CK, Gokce O, Gomez-Nicola D, González B, Gordon S, Graeber MB, Greenhalgh AD, Gressens P, Greter M, Gutmann DH, Haass C, Heneka MT, Heppner FL, Hong S, Hume DA, Jung S, Kettenmann H, Kipnis J, Koyama R, Lemke G, Lynch M, Majewska A, Malcangio M, Malm T, Mancuso R, Masuda T, Matteoli M, McColl BW, Miron VE, Molofsky AV, Monje M, Mraesko E, Nadjar A, Neher JJ, Neniskyte U, Neumann H, Noda M, Peng B, Peri



F, Perry VH, Popovich PG, Pridans C, Priller J, Prinz M, Ragozzino D, Ransohoff RM, Salter MW, Schaefer A, Schafer DP, Schwartz M, Simons M, Smith CJ, Streit WJ, Tay TL, Tsai LH, Verkhratsky A, von Bernhardi R, Wake H, Wittamer V, Wolf SA, Wu LJ, Wyss-Coray T. Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron*. 2022;110(21):3458-83.

71. Reichenbach A, Bringmann A. Glia of the human retina. *Glia*. 2020;68(4):768-96.

72. Iannaccone A, Hollingsworth TJ, Koirala D, New DD, Lenchik NI, Beranova-Giorgianni S, Gerling IC, Radic MZ, Giorgianni F. Retinal pigment epithelium and microglia express the CD5 antigen-like protein, a novel autoantigen in age-related macular degeneration. *Exp Eye Res*. 2017;155:64-74.

73. Kadlecova M, Freude K, Haukedal H. Complexity of Sex Differences and Their Impact on Alzheimer's Disease. *Biomedicines*. 2023;11(5).

74. Guillot-Sestier MV, Araiz AR, Mela V, Gaban AS, O'Neill E, Joshi L, Chouchani ET, Mills EL, Lynch MA. Microglial metabolism is a pivotal factor in sexual dimorphism in Alzheimer's disease. *Commun Biol*. 2021;4(1):711.

75. Franco-Bocanegra DK, Gourari Y, McAuley C, Chatelet DS, Johnston DA, Nicoll JAR, Boche D. Microglial morphology in Alzheimer's disease and after A $\beta$  immunotherapy. *Sci Rep*. 2021;11(1):15955.

76. Guneykaya D, Ivanov A, Hernandez DP, Haage V, Wojtas B, Meyer N, Maricos M, Jordan P, Buonfiglioli A, Gielniewski B, Ochocka N, Comert C, Friedrich C, Artiles LS, Kaminska B, Mertins P, Beule D, Kettenmann H, Wolf SA. Transcriptional and Translational Differences of Microglia from Male and Female Brains. *Cell Rep*. 2018;24(10):2773-83 e6.

77. Bourque M, Morissette M, Soulet D, Di Paolo T. Impact of sex on neuroimmune contributions to Parkinson's disease. *Brain Res Bull*. 2023;199:110668.

78. Villa A, Della Torre S, Maggi A. Sexual differentiation of microglia. *Front Neuroendocrinol*. 2019;52:156-64.

79. Wendimu MY, Hooks SB. Microglia Phenotypes in Aging and Neurodegenerative Diseases. *Cells*. 2022;11(13).

80. Villa A, Gelosa P, Castiglioni L, Cimino M, Rizzi N, Pepe G, Lolli F, Marcello E, Sironi L, Vegeto E, Maggi A. Sex-Specific Features of Microglia from Adult Mice. *Cell Rep*. 2018;23(12):3501-11.

81. Baba T. Choroidal Neovascularization Animal Models. *Choroidal Neovascularization*. 2020:37-46.

82. Ryan SJ. The development of an experimental model of subretinal neovascularization in disciform macular degeneration. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1979;77:707-45.

83. elDirini AA, Ogden TE, Ryan SJ. Subretinal endophotocoagulation. A new model of subretinal neovascularization in the rabbit. *Retina*. 1991;11(2):244-9.

84. Dobi ET, Puliafito CA, Destro M. A new model of experimental choroidal neovascularization in the rat. *Arch Ophthalmol*. 1989;107(2):264-9.

85. Tobe T, Ortega S, Luna JD, Ozaki H, Okamoto N, Derevjani NL, Viores SA, Basilico C, Campochiaro PA. Targeted disruption of the FGF2 gene does not prevent choroidal neovascularization in a murine model. *Am J Pathol.* 1998;153(5):1641-6.
86. Fabian-Jessing BK, Jakobsen TS, Jensen EG, Alsing S, Hansen S, Aagaard L, Askou AL, Bek T, Corydon TJ. Animal Models of Choroidal Neovascularization: A Systematic Review. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2022;63(9):11.
87. Espinosa-Heidmann DG, Marin-Castano ME, Pereira-Simon S, Hernandez EP, Elliot S, Cousins SW. Gender and estrogen supplementation increases severity of experimental choroidal neovascularization. *Exp Eye Res.* 2005;80(3):413-23.
88. Hope GM, Dawson WW, Engel HM, Ulshafer RJ, Kessler MJ, Sherwood MB. A primate model for age related macular drusen. *Br J Ophthalmol.* 1992;76(1):11-6.
89. Schnabolk G, Obert E, Banda NK, Rohrer B. Systemic Inflammation by Collagen-Induced Arthritis Affects the Progression of Age-Related Macular Degeneration Differently in Two Mouse Models of the Disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2020;61(14):11.
90. Yang X, Rai U, Chung JY, Esumi N. Fine Tuning of an Oxidative Stress Model with Sodium Iodate Revealed Protective Effect of NF- $\kappa$ B Inhibition and Sex-Specific Difference in Susceptibility of the Retinal Pigment Epithelium. *Antioxidants (Basel).* 2021;11(1).
91. Singh JN, Nowlin TM, Seedorf GJ, Abman SH, Shepherd DP. Quantifying three-dimensional rodent retina vascular development using optical tissue clearing and light-sheet microscopy. *J Biomed Opt.* 2017;22(7):76011.
92. Fontainhas AM, Wang M, Liang KJ, Chen S, Mettu P, Damani M, Fariss RN, Li W, Wong WT. Microglial morphology and dynamic behavior is regulated by ionotropic glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *PLoS One.* 2011;6(1):e15973.
93. Technology BB. PA1080\_Anti-VEGF/VEGFA-Antibody\_Datasheet: Boster Biological Technology; [Available from: <https://www.bosterbio.com/datasheet?sku=PA1080>].
94. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.* 2000;25(9-10):1439-51.
95. Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, Koeglperger T, Dake B, Wu PM, Doykan CE, Fanek Z, Liu L, Chen Z, Rothstein JD, Ransohoff RM, Gygi SP, Antel JP, Weiner HL. Identification of a unique TGF-beta-dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci.* 2014;17(1):131-43.
96. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci.* 2005;8(6):752-8.
97. abcam. Product datasheet Anti-Iba1 antibody ab5076 [Available from: <https://www.abcam.com/iba1-antibody-ab5076.html>].
98. Laitinen L. Griffonia simplicifolia lectins bind specifically to endothelial cells and some epithelial cells in mouse tissues. *Histochem J.* 1987;19(4):225-34.

99. Maddox DE, Shibata S, Goldstein IJ. Stimulated macrophages express a new glycoprotein receptor reactive with *Griffonia simplicifolia* I-B4 isolectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(1):166-70.
100. Xu H, Bickford JK, Luther E, Carpenito C, Takei F, Springer TA. Characterization of murine intercellular adhesion molecule-2. *The Journal of Immunology*. 1996;156(12):4909-14.
101. Brockmann C, Brockmann T, Dege S, Busch C, Kociok N, Vater A, Klussmann S, Strauß O, Joussem AM. Intravitreal inhibition of complement C5a reduces choroidal neovascularization in mice. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2015;253(10):1695-704.
102. Brockmann C, Kociok N, Dege S, Davids AM, Brockmann T, Miller KR, Joussem AM. Local partial depletion of CD11b(+) cells and their influence on choroidal neovascularization using the CD11b-HSVTK mouse model. *Acta Ophthalmol*. 2018;96(7):e789-e96.
103. Crespo-Garcia S, Corkhill C, Roubeix C, Davids AM, Kociok N, Strauss O, Joussem AM, Reichhart N. Inhibition of Placenta Growth Factor Reduces Subretinal Mononuclear Phagocyte Accumulation in Choroidal Neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58(12):4997-5006.
104. Crespo-Garcia S, Reichhart N, Hernandez-Matas C, Zabulis X, Kociok N, Brockmann C, Joussem AM, Strauss O. In vivo analysis of the time and spatial activation pattern of microglia in the retina following laser-induced choroidal neovascularization. *Exp Eye Res*. 2015;139:13-21.
105. Crespo-Garcia S, Reichhart N, Wigdahl J, Skosyrski S, Kociok N, Strauss O, Joussem AM. Lack of netrin-4 alters vascular remodeling in the retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2019.
106. Gong Y, Li J, Sun Y, Fu Z, Liu CH, Evans L, Tian K, Saba N, Fredrick T, Morss P, Chen J, Smith LE. Optimization of an Image-Guided Laser-Induced Choroidal Neovascularization Model in Mice. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132643.
107. Shah RS, Soetikno BT, Lajko M, Fawzi AA. A Mouse Model for Laser-induced Choroidal Neovascularization. *J Vis Exp*. 2015(106):e53502.
108. Poor SH, Qiu Y, Fassbender ES, Shen S, Woolfenden A, Delpero A, Kim Y, Buchanan N, Gebuhr TC, Hanks SM, Meredith EL, Jaffee BD, Dryja TP. Reliability of the mouse model of choroidal neovascularization induced by laser photocoagulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(10):6525-34.
109. Charbel Issa P, Singh MS, Lipinski DM, Chong NV, Delori FC, Barnard AR, MacLaren RE. Optimization of in vivo confocal autofluorescence imaging of the ocular fundus in mice and its application to models of human retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(2):1066-75.
110. Systems S. GFAP Data Sheet [Available from: [https://sysy.com/product-factsheet/SySy\\_173004](https://sysy.com/product-factsheet/SySy_173004)].
111. Herrspiegel C. Untersuchung zur Neurodegeneration in Ratten mit Diabetes mellitus, Hypertonie und Mäusen mit chronisch zerebraler Hypoperfusion: Charité - Universitätsmedizin Berlin; 2018.
112. Donaldson JG. Immunofluorescence Staining. *Curr Protoc Cell Biol*. 2015;69:4 3 1-4 3 7.

113. Molday LL, Cheng CL, Molday RS. Cell-Specific Markers for the Identification of Retinal Cells and Subcellular Organelles by Immunofluorescence Microscopy. *Methods Mol Biol.* 2019;1834:293-310.
114. Lambert V, Lecomte J, Hansen S, Blacher S, Gonzalez ML, Struman I, Sounni NE, Rozet E, de Tullio P, Foidart JM, Rakic JM, Noel A. Laser-induced choroidal neovascularization model to study age-related macular degeneration in mice. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2197-211.
115. Yi X, Ogata N, Komada M, Yamamoto C, Takahashi K, Omori K, Uyama M. Vascular endothelial growth factor expression in choroidal neovascularization in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1997;235(5):313-9.
116. Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LE. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(3):905-9.
117. Huang H, Parlier R, Shen JK, Luty GA, Viores SA. VEGF receptor blockade markedly reduces retinal microglia/macrophage infiltration into laser-induced CNV. *PLoS One.* 2013;8(8):e71808.
118. Stradleigh TW, Ishida AT. Fixation strategies for retinal immunohistochemistry. *Prog Retin Eye Res.* 2015;48:181-202.
119. Kugler EC, Greenwood J, MacDonald RB. The "Neuro-Glial-Vascular" Unit: The Role of Glia in Neurovascular Unit Formation and Dysfunction. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:732820.
120. Li L, Liu J, Xu A, Heiduschka P, Eter N, Chen C. Expression of purinergic receptors on microglia in the animal model of choroidal neovascularisation. *Sci Rep.* 2021;11(1):12389.
121. Zhu Y, Lu Q, Shen J, Zhang L, Gao Y, Shen X, Xie B. Improvement and optimization of standards for a preclinical animal test model of laser induced choroidal neovascularization. *PLoS One.* 2014;9(4):e94743.
122. Espinosa-Heidmann DG, Suner I, Hernandez EP, Frazier WD, Csaky KG, Cousins SW. Age as an Independent Risk Factor for Severity of Experimental Choroidal Neovascularization. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2002;43(5):1567-73.
123. Eter N, Engel DR, Meyer L, Helb HM, Roth F, Maurer J, Holz FG, Kurts C. In vivo visualization of dendritic cells, macrophages, and microglial cells responding to laser-induced damage in the fundus of the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(8):3649-58.
124. Li L, Heiduschka P, Alex AF, Niekammer D, Eter N. Behaviour of CD11b-Positive Cells in an Animal Model of Laser-Induced Choroidal Neovascularisation. *Ophthalmologica.* 2017;237(1):29-41.
125. Zhao M, Xie W, Tsai SH, Hein TW, Rocke BA, Kuo L, Rosa RH, Jr. Intravitreal Stanniocalcin-1 Enhances New Blood Vessel Growth in a Rat Model of Laser-Induced Choroidal Neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018;59(2):1125-33.
126. Kohno H, Chen Y, Kevany BM, Pearlman E, Miyagi M, Maeda T, Palczewski K, Maeda A. Photoreceptor proteins initiate microglial activation via Toll-like receptor 4 in retinal degeneration mediated by all-trans-retinal. *J Biol Chem.* 2013;288(21):15326-41.

127. Kim SY, Yang HJ, Chang YS, Kim JW, Brooks M, Chew EY, Wong WT, Fariss RN, Rachel RA, Cogliati T, Qian H, Swaroop A. Deletion of aryl hydrocarbon receptor AHR in mice leads to subretinal accumulation of microglia and RPE atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(9):6031-40.
128. Makabe K, Sugita S, Mandai M, Futatsugi Y, Takahashi M. Microglia dynamics in retinitis pigmentosa model: formation of fundus whitening and autofluorescence as an indicator of activity of retinal degeneration. *Sci Rep.* 2020;10(1):14700.
129. Chen G, Luo X, Qadri MY, Berta T, Ji RR. Sex-Dependent Glial Signaling in Pathological Pain: Distinct Roles of Spinal Microglia and Astrocytes. *Neurosci Bull.* 2018;34(1):98-108.
130. Pekny M, Wilhelmsson U, Pekna M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci Lett.* 2014;565:30-8.
131. Chisholm NC, Sohrabji F. Astrocytic response to cerebral ischemia is influenced by sex differences and impaired by aging. *Neurobiol Dis.* 2016;85:245-53.
132. Azcoitia I, Santos-Galindo M, Arevalo MA, Garcia-Segura LM. Role of astroglia in the neuroplastic and neuroprotective actions of estradiol. *Eur J Neurosci.* 2010;32(12):1995-2002.
133. Biechele G, Franzmeier N, Blume T, Ewers M, Luque JM, Eckenweber F, Sacher C, Beyer L, Ruch-Rubinstein F, Lindner S, Gildehaus FJ, von Ungern-Sternberg B, Cumming P, Bartenstein P, Rominger A, Höglinger GU, Herms J, Brendel M. Glial activation is moderated by sex in response to amyloidosis but not to tau pathology in mouse models of neurodegenerative diseases. *J Neuroinflammation.* 2020;17(1):374.
134. Wang J, Sareddy GR, Lu Y, Pratap UP, Tang F, Greene KM, Meyre PL, Tekmal RR, Vadlamudi RK, Brann DW. Astrocyte-Derived Estrogen Regulates Reactive Astroglia and is Neuroprotective following Ischemic Brain Injury. *J Neurosci.* 2020;40(50):9751-71.
135. Loram LC, Sholar PW, Taylor FR, Wiesler JL, Babb JA, Strand KA, Berkelhammer D, Day HE, Maier SF, Watkins LR. Sex and estradiol influence glial pro-inflammatory responses to lipopolysaccharide in rats. *Psychoneuroendocrinology.* 2012;37(10):1688-99.
136. Santos-Galindo M, Acaz-Fonseca E, Bellini MJ, Garcia-Segura LM. Sex differences in the inflammatory response of primary astrocytes to lipopolysaccharide. *Biol Sex Differ.* 2011;2:7.
137. Cordeau P, Jr., Lalancette-Hebert M, Weng YC, Kriz J. Live imaging of neuroinflammation reveals sex and estrogen effects on astrocyte response to ischemic injury. *Stroke.* 2008;39(3):935-42.
138. Arias C, Zepeda A, Hernandez-Ortega K, Leal-Galicia P, Lojero C, Camacho-Arroyo I. Sex and estrous cycle-dependent differences in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the adult rat hippocampus. *Horm Behav.* 2009;55(1):257-63.
139. Trotta MC, Gharbia S, Herman H, Mladin B, Hermenean A, Balta C, Cotoraci C, Petcu VE, Gesualdo C, Petrillo F, Galdiero M, Alfano R, Gherghiceanu M, D'Amico M, Rossi S, Hermenean A. Sex and Age-Related Differences in Neuroinflammation and Apoptosis in Balb/c Mice Retina Involve Resolvin D1. *Int J Mol Sci.* 2021;22(12).

140. Singh R, Wolk A, Batoki J, Kang S, Suh J, Ali M, Anand-Apte B. Longitudinal Progression of Laser Induced Choroidal Neovascularization in Mice-Effect of age and sex. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2021;62(11):80-

## 11 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Petra Althoff, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Geschlechtsspezifische Untersuchung von Pathologie und Immunantwort in einem Mausmodell für Choroidale Neovaskularisation / sex-related differences in pathology and immune response in a mouse model for choroidal neovascularization“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe. Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## **12 Tabellarischer Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht



## **13 Danksagung**

Ich danke Frau Prof. Antonia Jousen und Frau Dr. Susanne Wolf vielmals für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit zum wissenschaftlichen Arbeiten und die gute Betreuung.

Frau Inga-Marie Pompös, Herrn Prof. Olaf Strauß, Frau PD Anna-Karina Maier-Wenzel, Herrn Dr. Norbert Kociok und Herrn Sergej Skosyrski sowie dem gesamten Team der Experimentellen Forschungsabteilung der Augenklinik danke ich für die gegenseitige Unterstützung und gute Zusammenarbeit.

Bei meinen lieben Freunden möchte ich mich für die stets ermunternden Gespräche und die gemeinsamen Stunden in der Bibliothek bedanken.

Zuletzt bin ich meiner wundervollen Familie und meinem Freund für ihre Geduld, ihre endlose Unterstützung und stetige Liebe in allen Lebenslagen zutiefst dankbar.