

Inhalt

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

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

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

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

11. Erklärung.....	183
--------------------	-----