

Aus der Klinik für Ophthalmologie
(Direktor: Prof. Dr. Johann Roider)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Einfluss Selektiver Retinatherapie (SRT) und
Thermischer Stimulation der Retina (TSR) auf die
Sekretion von Zellmediatoren zur Untersuchung
möglicher neuroprotektiver Eigenschaften**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Julia Katharina Papenkort
aus Bonn

Kiel (2021)

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. Alexa Klettner

2. Berichterstatterin: PD Dr. Vicky Wätzig

Tag der mündlichen Prüfung: 07.02.2023

zum Druck genehmigt, Kiel, den 03.10.2021

gez.: Prof. Dr. Alexa Klettner

Vorsitzende der Prüfungskommission

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
TABELLENVERZEICHNIS.....	X
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 ANATOMIE DES AUGES	1
1.1.1 Anatomie der Retina.....	1
1.1.2 Der Komplex aus Retinalem Pigmentepithel (RPE), Bruch´scher Membran (BrM) und Choroidea	2
1.1.3 Neuroprotektion am Auge.....	6
1.2 ALTERSABHÄNGIGE MAKULADEGENERATION (AMD)	8
1.2.1 Epidemiologie und die Auswirkungen für die Gesellschaft	9
1.2.2 Ätiologie und klinische Klassifikation	9
1.2.3 Relevante Zellmediatoren der Altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) ..	13
1.2.4 Neuroprotektion als therapeutischer Ansatz der Altersabhängigen Makuladegeneration (AMD)	14
1.3 LASERVERFAHREN	15
1.3.1 Lasertherapie in der Augenheilkunde.....	15
1.3.2 Selektive Retinatherapie (SRT)	17
1.3.3 Thermische Stimulation der Retina (TSR)	18
2 FRAGESTELLUNG	20
3 MATERIAL UND METHODEN	21
3.1 MATERIAL	21
3.1.1 Geräte und Instrumente	21
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	22
3.1.3 Chemikalien	23
3.1.4 Zellkulturmedien.....	23
3.1.5 Kits für die Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA).....	25
3.1.6 Software	25
3.2 METHODEN DER ORGANKULTUR.....	25
3.2.1 Die Präparation der Organkulturen aus Retinalem Pigmentepithel, Bruch´scher Membran und Choroidea	25
3.2.2 Kultivierung der Gewebeexplantate in modifizierten Ussingkammern	27
3.2.3 Calcein-Assay zur Bestimmung der Zellviabilität der Organkulturen.....	28
3.3 LASERVERFAHREN	29
3.3.1 Beschreibung des Lasersystems	29
3.3.2 Laserbehandlungen im Organkulturmodell	31
3.3.3 Titration des Zellschadens im Retinalen Pigmentepithel	32
3.4 GEWINNUNG DER ORGANKULTURÜBERSTÄNDE	34
3.5 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA).....	35
3.6 KULTIVIERUNG DER SH-SY5Y ZELLEN	36
3.6.1 Die SH-SY5Y-Zelllinie als neuronales Zellmodell	36
3.6.2 Auftauen der Zellen	37

3.6.3	Passagieren der Zellen.....	37
3.6.4	Vorversuche für die Kultivierung der SH-SY5Y-Zellen auf 96-Well-Platten	38
3.6.5	Aussaat und Kultivierung der SH-SY5Y-Zellen auf 96-Well-Platten.....	38
3.6.6	Titration der erforderlichen Stresskonzentration	41
3.6.7	Zugabe der apikalen Organkulturüberstände von Tag eins und Tag drei.....	43
3.7	METHYL-THIAZOLYL-TETRAZOLIUM (MTT)-ASSAY	44
3.8	STATISTIK.....	45
4	ERGEBNISSE	47
4.1	TITRATION DES ZELLSCHADENS DURCH DIE LASERBEHANDLUNGEN	47
4.1.1	Titration des Zellschadens nach Selektiver Retinatherapie.....	47
4.1.1.1	100 µm Spotgröße.....	48
4.1.1.2	200 µm Spotgröße.....	48
4.1.2	Titration des Zellschadens nach Thermischer Stimulation der Retina	49
4.1.2.1	100 µm Spotgröße.....	49
4.1.2.2	200 µm Spotgröße.....	50
4.2	SEKRETION NEUROPROTEKTIVER ZELLMEDIATOREN NACH LASERBEHANDLUNG	51
4.2.1	Ausschüttung des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	51
4.2.1.1	Behandlung mittels Selektiver Retinatherapie	51
4.2.1.2	Behandlung mittels Thermischer Stimulation der Retina.....	51
4.2.2	Ausschüttung des Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF)	52
4.2.2.1	Behandlung mittels Selektiver Retinatherapie	53
4.2.2.2	Behandlung mittels Thermischer Stimulation der Retina.....	53
4.2.3	Ausschüttung des Brain-Derived Neurotropic Factor (BDNF)	54
4.2.4	Ausschüttung des Nerve Growth Factor (NGF)	55
4.2.5	Ausschüttung des Transforming Growth Factor beta (TGF-β)	55
4.2.5.1	Behandlung mittels Selektiver Retinatherapie	55
4.2.5.2	Behandlung mittels Thermischer Stimulation der Retina.....	56
4.3	ERGEBNISSE DES SH-SY5Y-ZELLMODELLS	57
4.3.1	Vorversuche zur Kultivierung der SH-SY5Y-Zellen auf der 96-Well-Platte.....	57
4.3.2	Stresstitration für die SH-SY5Y-Zellen.....	57
4.3.2.1	Stresstitration bei Verwendung von Grundmedium.....	57
4.3.2.2	Stresstitration bei Verwendung von Organkulturmedium	58
4.3.3	Einfluss verschiedener Konzentrationen von Fetalem Kälberserum (FCS) in der Kultivierung auf die Stressresistenz der SH-SY5Y-Zellen.....	60
4.3.4	Austestung der Stressresistenz der Zellen mit den Organkulturüberständen.....	62
4.3.4.1	Ergebnisse der Überstände von Tag eins	62
4.3.4.2	Ergebnisse der Überstände von Tag drei	64
5	DISKUSSION.....	67
5.1	VORTEILE UND LIMITATIONEN DES VERWENDETEN MODELLS.....	67
5.2	BEHANDLUNGEN DER ORGANKULTUREN MIT DEN BEIDEN LASERVERFAHREN.....	69
5.3	EINFLUSS DER LASERBEHANDLUNGEN AUF DIE APIKALE ZELLMEDIATORAUSSCHÜTTUNG IM ORGANKULTURMODELL	71
5.4	EINFLUSS DER LASERBEHANDLUNGEN IM NEURONALEN ZELLMODELL DER SH-SY5Y-ZELLEN.....	74
5.5	FAZIT UND ZUKUNFTSAUSSICHT	77
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	79
7	LITERATURVERZEICHNIS	81

8	ANHANG	89
9	DANKSAGUNG.....	94
10	VERÖFFENTLICHUNGEN	95
11	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	96

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
AREDS	<i>Age Related Eye Disease Study</i> / Studie der altersabhängigen Augenerkrankungen
AT	Österreich
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotropic Factor</i> / dem Gehirn entstammender neurotropher Faktor
BrM	Bruch'sche Membran
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CA	Kalifornien, Bundesstaat Vereinigte Staaten von Amerika
CAU	Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
CH	Schweiz
cm ²	Quadratzentimeter
CNV	choroidale Neovaskularisation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cw	<i>continuous wave</i> / Dauerstrich
DE	Deutschland
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> / enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	<i>fetal calf serum</i> / Fetales Kälberserum
GM	Grundmedium
h	<i>hour</i> / Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IT	Italien
JP	Japan
KM1	Kulturmedium 1

KM2	Kulturmedium 2
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> / Lichtverstärkung durch stimulierte Emission von Strahlung
M	Mol
MA	Massachusetts, Bundesstaat der Vereinigten Staaten von Amerika
mg	Milligramm
MI	Michigan, Bundesstaat der Vereinigten Staaten von Amerika
min	Minute
mJ	Millijoule
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloprotease
MN	Minnesota, Bundesstaat der Vereinigten Staaten von Amerika
MTT	Methyl-thiazolyl-tetrazolium
ms	Millisekunden
mW	Milliwatt
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid (protonierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (protonierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i> / Nervenwachstumsfaktor
nm	Nanometer
NY	New York, Bundesstaat der Vereinigten Staaten von Amerika
O ₂	Sauerstoff
OKM	Organkulturmedium

p	p-Wert / Signifikanzniveau
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PEDF	<i>Pigment Epithelium-Derived Factor</i> / dem Pigmentepithel entstammender Faktor
pg	Pikogramm
ROS	<i>reactive oxygen species</i> / reaktive Sauerstoffspezies
RPE	Retinales Pigmentepithel
rpm	<i>rounds per minute</i> / Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Royal Park Memorial Institute</i> Zellkulturmedium
s.o.	siehe oben
SRT	Selektive Retinatherapie
STABW	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TBHP	tert-Butylhydroperoxid
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor beta</i> / Transformierender Wachstumsfaktor beta
TSR	Thermische Stimulation der Retina
TX	Texas, Bundesstaat der Vereinigten Staaten von Amerika
u.a.	unter anderem
USA	<i>United States of America</i> / Vereinigte Staaten von Amerika
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> / vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
vs.	versus
VT	Vermont, Bundesstaat der Vereinigten Staaten von Amerika
WA	Washington, Bundesstaat der Vereinigten Staaten von Amerika
WI	Wisconsin, Bundesstaat der Vereinigten Staaten von Amerika
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
λ	Wellenlänge
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

μM

Mikromolar

μs

Mikrosekunde

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Schematische Darstellung des Komplexes aus Retinalem Pigmentepithel (RPE), Bruch'scher Membran (BrM) und Choroidea in anatomischer Beziehung zu den Photorezeptoren
Abbildung 2	Säulenmodell der Pathogenese der Altersabhängigen Makuladegeneration (AMD)
Abbildung 3	Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Lasers
Abbildung 4	Präparation von Organkulturen aus frischen porcinen Augen
Abbildung 5	Kultivierung von Organkulturen in der modifizierten Ussingkammer
Abbildung 6	Aufbau des Lasersystems zur Behandlung der Organkulturen
Abbildung 7	Laserbehandlung der Organkulturen
Abbildung 8	Titration des Zellschadens der Laserbehandlungen
Abbildung 9	Schematische Darstellung eines <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) nach dem Sandwich-Prinzip
Abbildung 10	SHSY-5Y-Zellen in der Kultivierung mit Ausbildung von Differenzierungsmerkmalen
Abbildung 11	Schematische Darstellung des Versuchsablaufes zur Untersuchung der Auswirkungen der Organkulturüberstände auf SH-SY5Y-Zellen
Abbildung 12	Ausschüttung des <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> in den apikalen Überständen an Tag drei nach Behandlung der Organkulturen mit Selektiver Retinatherapie (SRT) und Thermischer Stimulation der Retina (TSR)
Abbildung 13	Ausschüttung des <i>Pigment Epithelium-Derived Factor</i> in den apikalen Überständen an Tag drei nach Behandlung der Organkulturen mit Selektiver Retinatherapie (SRT) und Thermischer Stimulation der Retina (TSR)
Abbildung 14	Ausschüttung des <i>Transforming Growth Factor beta</i> (TGF- β) in den apikalen Überständen an Tag drei nach Behandlung der Organkulturen mit Selektiver Retinatherapie (SRT) und Thermischer Stimulation der Retina (TSR)
Abbildung 15	Stresstitration auf Basis von Grundmedium (GM)

Abbildung 16	Stresstitration auf Basis von Organkulturmedium (OKM)
Abbildung 17	Zellviabilität der neuronalen SH-SY5Y-Zellen unter dem Einfluss von oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in Abhängigkeit von verschiedenen Medien in der Kultivierung
Abbildung 18	Zellviabilität der SH-SY5Y-Zellen nach Zugabe der apikalen Organkulturüberstände von Tag eins, Inkubation für eine Stunde und Zugabe von oxidativem Stress
Abbildung 19	Zellviabilität der SH-SY5Y-Zellen nach Zugabe der apikalen Organkulturüberstände von Tag eins, Inkubation für 24 Stunden und Zugabe von oxidativem Stress
Abbildung 20	Zellviabilität der SH-SY5Y-Zellen nach Zugabe der apikalen Organkulturüberstände von Tag drei, Inkubation für 24 Stunden und Zugabe von oxidativem Stress

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Auflistung aller verwendeten Geräte und Instrumente
Tabelle 2	Auflistung aller Verbrauchsmaterialien
Tabelle 3	Auflistung aller verwendeten Chemikalien
Tabelle 4	Auflistung aller Zellkulturmedien und Zusätze
Tabelle 5	Auflistung der Rezepturen der verwendeten Zellkulturmedien
Tabelle 6	Auflistung der verwendeten, kommerziell erworbenen Kits für die <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assays</i> (ELISA)
Tabelle 7	Auflistung der verwendeten Software
Tabelle 8	Auflistung der Stressorkonzentrationen, welche mit dem Grundmedium (GM) ausgetestet wurden
Tabelle 9	Auflistung der Stressorkonzentrationen, welche mit dem Organkulturmedium (OKM) ausgetestet wurden
Tabelle 10	Anzahl der Wiederholungen der <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assays</i> (ELISA)
Tabelle 11	Titration des Zellschadens nach Behandlung der Organkulturen mit der Selektiven Retinatherapie (SRT)
Tabelle 12	Titration des Zellschadens nach Behandlung der Organkulturen mittels Thermischer Stimulation der Retina (TSR)
Tabelle 13	Ergebnisse der Stresstitration von Wasserstoffperoxid (H_2O_2), tert-Butylhydroperoxid (TBHP) und Erastin auf Basis von Grundmedium (GM) in Ergänzung zu Abbildung 15
Tabelle 14	Ergebnisse der Stresstitration von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) auf Basis von Organkulturmedium (OKM) mit unterschiedlicher Vorinkubation von einer oder 24 Stunden (h) in Ergänzung zu Abbildung 16
Tabelle 15	Ergebnisse der Stresstitration von tert-Butylhydroperoxid (TBHP) auf Basis von Organkulturmedium (OKM) mit unterschiedlicher Vorinkubation von einer oder 24 Stunden (h) in Ergänzung zu Abbildung 16
Tabelle 16	Ergebnisse der Stresstitration von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bei vorangegangener Kultivierung der SH-SY5Y-Zellen mit Kulturmedium 1 mit einem Anteil an fetalem Kälberserum (FCS)

von 10 % auf der 96-Well-Platte über 96 Stunden, in Ergänzung zu Abbildung 17

Tabelle 17 Ergebnisse der Stresstitration von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bei vorangegangener Kultivierung der SH-SY5Y-Zellen mit Organkulturmedium mit einem Anteil an Fetalem Kälberserum (FCS) von 10 % auf der 96-Well-Platte über 96 Stunden, in Ergänzung zu Abbildung 17

Tabelle 18 Zellviabilität der SH-SY5Y-Zellen nach Zugabe der apikalen Organkulturüberstände von Tag eins, Inkubation für eine Stunde und Zugabe von oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in Ergänzung zu Abbildung 18

Tabelle 19 Zellviabilität der SH-SY5Y-Zellen nach Zugabe der apikalen Organkulturüberstände von Tag eins, Inkubation für 24 Stunden und Zugabe von oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in Ergänzung zu Abbildung 19

Tabelle 20 Zellviabilität der SH-SY5Y-Zellen nach Zugabe der apikalen Organkulturüberstände von Tag drei, Inkubation für 24 Stunden und Zugabe von oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in Ergänzung zu Abbildung 20

1 EINLEITUNG

1.1 Anatomie des Auges

Das Auge ist eines der wichtigsten Sinnesorgane des Menschen. Es spielt eine zentrale Rolle bei der Orientierung und dominiert die menschliche Lebensweise. Über das Auge erfolgt die Wahrnehmung von Lichtimpulsen, indem diese in neuronale Signale umgewandelt werden (Eysel 2010). Einschränkungen der Sehschärfe (Visus) führen zu einer gravierenden Reduktion der Lebensqualität.

Das menschliche Auge lässt sich funktionell in den lichtbrechenden oder dioptrischen Apparat, bestehend aus Cornea, Kammerwasser, Linse und Glaskörper, und einen lichtwahrnehmenden Teil, die Retina mit ihren versorgenden Strukturen, einteilen. Der dioptrische Anteil des Auges spielt für das Verständnis dieser Arbeit keine Rolle und wird somit nicht weiter betrachtet. In den folgenden Abschnitten werden die anatomischen Strukturen näher vorgestellt, die für das Verständnis dieser Arbeit relevant sind.

1.1.1 Anatomie der Retina

Die Retina dient dem Aufnehmen und Verarbeiten von Lichtreizen und besteht aus zehn verschiedenen Schichten. Die neun inneren Schichten lassen sich als Neuroretina zusammenfassen. Diese beinhaltet neben den höherrangigen, integrierenden Zellen (Bipolar- und Ganglienzellen) und Interneuronen (Horizontalzellen und amakrine Zellen) die lichtempfindlichen Photorezeptorzellen (Stäbchen und Zapfen) (Lüllmann-Rauch u. Asan 2019; Eysel 2010). Die Stäbchen sind für das Hell-Dunkel-Sehen und das Erkennen von Kontrasten relevant, die Zapfen vermitteln das Farbsehen. Die Photorezeptorzellen grenzen basal an das Retinale Pigmentepithel (RPE), welches der Bruch'schen Membran (BrM) anliegt. Diese wiederum liegt der Choroidea auf.

Die menschliche Retina ist regional unterschiedlich aufgebaut. So gibt es mit dem gelben Fleck beziehungsweise (bzw.) der *Macula lutea* eine Region, die eine besonders hohe räumliche Auflösung der Lichtreize aufweist. Sie ermöglicht dem Menschen das präzise Sehen und wird im Folgenden als Makula bezeichnet. In ihrer Mitte beinhaltet sie die *Fovea centralis*, welche der Ort des schärfsten Sehens ist. In

dieser Fovea liegen nahezu ausschließlich Zapfen in sehr hoher Dichte, die in einem Verhältnis von 1:1 mit den nachfolgenden Bipolarzellen verschaltet sind. So wird die größtmögliche Auflösung erzeugt. Die inneren Retinaschichten sind an den Rand der *Fovea centralis* verlagert (Lüllmann-Rauch u. Asan 2019). Im Zentrum der *Fovea centralis* liegt ein kleineres Areal, die *Foveola*. Die Zapfen in der *Foveola* sind nur von Ausläufern der Müller-Zellen bedeckt, um eine möglichst geringe Streuung des einfallenden Lichts zu ermöglichen (Lüllmann-Rauch u. Asan 2019). Außerdem finden sich keine retinalen Blutgefäße im Bereich der Fovea, da diese ansonsten den Seheindruck verschlechtern würden. Im parafovealen Bereich der Makula kommen wieder vermehrt Stäbchen vor, sodass das Verhältnis von Stäbchen und Zapfen ungefähr 1:1 ist (Lüllmann-Rauch u. Asan 2019). Außerhalb der Makula nehmen die Zapfen rasch ab (Lüllmann-Rauch u. Asan 2019), sodass die Stäbchen überwiegen. Die anatomischen Besonderheiten im Bereich der Makula erklären die gravierenden Auswirkungen auf das Sehvermögen, wenn Schädigungen in dieser Region auftreten. Dies wird in Abschnitt 1.2 näher erläutert.

1.1.2 Der Komplex aus Retinalem Pigmentepithel (RPE), Bruch'scher Membran (BrM) und Choroidea

Das RPE, die BrM und die Choroidea bilden einen funktionellen Komplex (Bhutto u. Luty 2012), welcher im Fokus dieser Arbeit steht.

Das RPE gehört als äußerste Schicht zur zehnschichtigen Retina. Die anatomischen Beziehungen des RPE sind in Abbildung (Abb.) 1 dargestellt. Die RPE-Zelle weist eine hexagonale Form auf und liegt im postmitotischen Stadium vor (Lakkaraju et al. 2020). Die Zellen sind polarisiert und unterscheiden sich daher in einen basalen und apikalen Anteil (Lakkaraju et al. 2020). Basal liegt der Zellkern umgeben von nicht-pigmentiertem Zytoplasma. Dieser basale Anteil der RPE-Zelle interagiert mit der BrM und der Choroidea. Die apikale Zellmembran der RPE-Zelle trägt zahlreiche Mikrovilli, welche die Vernetzung und direkte Interaktion mit den Außensegmenten der Photorezeptoren ermöglichen (Strauss 2005).

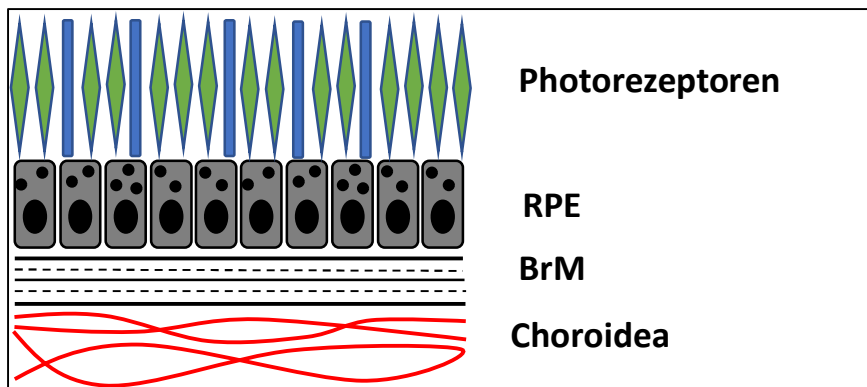


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Komplexes aus Retinalem Pigmentepithel (RPE), Bruch'scher Membran (BrM) und Choroidea in anatomischer Beziehung zu den Photorezeptoren. Das RPE steht in einem funktionellen Komplex mit der BrM und der Choroidea, gehört jedoch als zehnte Schicht noch zur Retina. Es interagiert auf der apikalen Seite mit den Außensegmenten der Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen - hier dargestellt als blaue Stäbchen und grüne Rauten / Zapfen). Auf der basalen Seite grenzt das RPE an die BrM.

Weiterhin sind die RPE-Zellen über apikale Verschlusskontakte (*tight junctions*) miteinander verbunden. Diese gewährleisten die Aufrechterhaltung der Blut-Retina-Schranke (Chen et al. 2019). Die Blut-Retina-Schranke, unterstützt durch regulatorische Mechanismen der RPE-Zellen (Klettner 2015), spielt eine tragende Rolle bei der Aufrechterhaltung des Immunprivilegs (Lüllmann-Rauch u. Asan 2019). Somit ist sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunreaktion in der Retina herabgesetzt. Das Immunprivileg des Auges wurde 1948 das erste Mal von Peter Medawar beschrieben. Er hatte festgestellt, dass in das okuläre System eingebrachte Fremdgewebe eine längere Überlebenszeit aufwies als Fremdgewebe, welches in andere Gewebe transplantiert wurde (Medawar 1948). Da Neurone des zentralen Nervensystems (ZNS) und somit auch die Neuroretina sehr empfindlich auf ablaufende immunologische Prozesse reagieren (Klettner 2015), ist die Unterdrückung von Immunreaktionen innerhalb der Retina eine essentielle Voraussetzung für das einwandfreie Sehen.

Der apikale Teil der RPE-Zelle ist mit zahlreichen Melanosomen im Zytoplasma ausgestattet (Lüllmann-Rauch u. Asan 2019) und weist dadurch eine starke Pigmentierung auf (Strauss 2005). Das einfallende Licht kann somit absorbiert werden, nachdem es in der Photorezeptorschicht wahrgenommen wurde. Dies ist notwendig, um Streustrahlung zu verhindern, welche den Seheindruck verfälschen würde. Weiterhin wird eine Wärmeentwicklung reduziert und die Belastung durch einfallendes Licht für nachfolgende Zellen gering gehalten (Kanski u. Bowling 2012). Die Absorption

führt allerdings in der RPE-Zelle zu einer erhöhten Belastung und begünstigt den oxidativen Stress, welcher in der erhöhten metabolischen Aktivität und den hohen Sauerstoffkonzentrationen begründet liegt.

Als protektive Mechanismen gegen den oxidativen Stress greifen die hohe Dichte an Melanosomen sowie detoxifizierende Systeme und die Ausschüttung protektiver Wachstumsfaktoren. So haben RPE-Zellen Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress (Klettner 2012).

Das RPE hat neben der Absorption von Lichtenergie durch die zahlreichen Melanosomen (Lüllmann-Rauch u. Asan 2019), der immunologischen Funktion (Klettner 2015) und der Aufrechterhaltung der Blut-Retina-Schranke über *tight junctions* (Lüllmann-Rauch u. Asan 2019) viele weitere Aufgaben für die Aufrechterhaltung des Sehvermögens. So gewährleistet es über zahlreiche Transportvorgänge in Richtung der Neuroretina die Ernährung der Photorezeptoren und ebenfalls die Entsorgung von Abfallprodukten aus deren Metabolismus über den Transport von der Neuroretina zurück zu der Choroidea (Strauss 2005). Die Photorezeptoren haben einen extrem hohen Sauerstoffbedarf (Klettner 2015; Bhutto u. Luty 2012). Die Sauerstoffversorgung der Photorezeptoren erfolgt mittels Diffusion über das RPE (Strauss 2005). Durch die anatomische und physiologische Abschottung der Neuroretina von der Blutversorgung sind die Photorezeptoren auf die Versorgung durch die RPE-Zellen angewiesen. Somit führt ein Funktionsverlust des RPE im Verlauf zu einem Absterben der Photorezeptoren (Klettner 2015; Bhutto u. Luty 2012).

Ebenfalls essentiell für die korrekte Funktionsweise der Photorezeptoren ist das Recycling der verbrauchten Sehpigmente, welches von dem RPE übernommen wird. Bei der Photonenabsorption durch die Photorezeptoren entsteht aus 11-cis-Retinal des Sehpigmentes das all-trans-Retinal. Dieses wird durch die RPE-Zelle wieder zu 11-cis-Retinal umgewandelt, welches dann erneut in das Sehpigment eingebaut werden kann. Somit ist das RPE direkter Bestandteil des visuellen Zyklus (Bok 1993) und trägt damit maßgeblich zu dem Erhalt der Erregbarkeit der Photorezeptoren bei. Darüber hinaus erfolgt die Phagozytose der von den Photorezeptoren abgestoßenen Außensegmente (Young 1967), welche sich regelmäßig erneuern.

Auf der basalen Seite interagieren die RPE-Zellen über Zellfortsätze mit der Basallamina des RPE. Die BrM stellt die Extrazellulärmatrix (EZM) zwischen dem RPE und der Choroidea dar (siehe auch Abb. 1). Sie bildet ein molekulares Sieb und somit eine Diffusionsbarriere, damit die Retina vor Immunzellen und anderen Substanzen im

Blut der Choroidea geschützt ist. Die BrM ist aus fünf verschiedenen Schichten aufgebaut, welche von innen nach außen die bereits erwähnte Basallamina des RPE, eine innere kollagene Schicht, eine Schicht aus elastischen Fasern, eine äußere kollagene Schicht und die Basallamina der Choriokapillaris sind (Lüllmann-Rauch u. Asan 2019; Bhutto u. Luty 2012). Diese pentalamelläre Membran besteht hauptsächlich aus Kollagenmolekülen der Typen I, III, IV und VI (Chen et al. 2003) und darüber hinaus aus Fibronectin (Pauleikhoff et al. 1992), Laminin (Aisenbrey et al. 2006), Proteoglykanen und Glycosaminoglycanen (Hewitt et al. 1989).

Basal der BrM findet sich das fenestrierte Endothel des in der Choroidea gelegenen Kapillarbettes, welches *Choriocapillaris* genannt wird. Dieses gut durchblutete Kapillarbett in direkter räumlicher Nähe zu der BrM ermöglicht durch die Fenestrierung des Endothels einen ungehinderten Austausch von Nähr- und Abfallstoffen. Über die BrM als grobmaschiges Gitter und das RPE als aktiven Filter und Transporter verläuft die Versorgung der Photorezeptoren mit Nährstoffen und Sauerstoff (Wangsa-Wirawan u. Linsenmeier 2003). Eine Störung dieses Ver- und Entsorgungssystems kann zu einer Schädigung der Photorezeptoren führen. Darüber hinaus haben die Kapillaren in der Choroidea die Funktion der Wärmeableitung, welche durch das gebündelte einfallende Licht entsteht. Somit sorgt der Abtransport der thermischen Energie für eine Kühlung der Photorezeptoren und des RPE (Nickla u. Wallman 2010), was bedeutsam für die einwandfreie Funktion des Gewebekomplexes ist.

Neben dem choroidalen Blutkreislauf gibt es noch einen retinalen Blutkreislauf für die Versorgung des Auges. Die Versorgung der Photorezeptoren wird mit Sauerstoff bei Dunkelheit zu 90 % über die Choroidea und lediglich zu 10 % durch das retinale Gefäßsystem übernommen (Linsenmeier u. Braun 1992; Nickla u. Wallman 2010). In der *Fovea centralis*, dem Ort des schärfsten Sehens, wird die Versorgung ausnahmslos von der Choroidea übernommen, da in diesem Bereich für die Gewährleistung der optimalen optischen Eigenschaften physiologisch keine retinalen Blutgefäße vorliegen.

Im Rahmen des physiologischen Alterungsprozesses kommt es zu zunehmenden Funktionseinschränkungen des Komplexes aus RPE, BrM und Choroidea. So nimmt beispielsweise die Diffusionskapazität der BrM ab (Lee et al. 2015). Daher kommt es zu einer erschwerten Versorgung der Photorezeptoren mit Sauerstoff und Nährstoffen, welche in einer Degeneration derselbigen resultieren kann. Außerdem ist der Abtransport von teilweise toxischen Stoffwechselprodukten innerhalb der RPE-Zellen

und in ihrer unmittelbaren Umgebung erschwert, wodurch diese akkumulieren und zellschädigend wirken können. Der Rückgang der Diffusionskapazität liegt unter anderem (u.a.) in einer Verdickung der BrM durch lipidreiche Ablagerungen begründet (Curcio 2018). Darüber hinaus entsteht zunehmend oxidativer Stress, der wiederum zu einer Zytotoxizität führt (Sparrow et al. 1999). Dieser wird außerdem dadurch begünstigt, dass es mit zunehmendem Alter zu einem Rückgang der Melanosomen in den RPE-Zellen kommt, welcher zu einer Verminderung der Photonen-Absorption führt. Unter Punkt 1.2 wird weiter auf die Bedeutung dieser Altersphänomene für die Entwicklung von altersabhängigen Erkrankungen eingegangen.

1.1.3 Neuroprotektion am Auge

Das Auge beinhaltet mit den ersten drei Neuronen der Sehbahn (Erstes Neuron: Photorezeptorzelle, zweites Neuron: bipolare Zelle, drittes Neuron: Ganglienzelle) innerhalb der Neuroretina (Lüllmann-Rauch u. Asan 2019; Eysel 2010) Zellen des ZNS. Somit ist eine über die Homöostase geregelte neuroprotektive Zellumgebung Voraussetzung für eine bestmögliche Verarbeitung des Seheindrucks. In den Photorezeptoren, Bipolarzellen, Horizontalzellen und den amakrinen Zellen erfolgt die elektrische Signalverarbeitung über fein abgestufte Änderungen des Membranpotentials, synaptische Übertragung und postsynaptische Potentiale. An den Ganglienzellen treten innerhalb der Retina erstmalig Aktionspotentiale auf (Eysel 2010). Da die Photorezeptoren einem hohen Zellstress ausgesetzt sind, ist ein neuroprotektives Zellmilieu über die Reduktion von Stressfaktoren innerhalb der Neuroretina förderlich für die einwandfreie Funktion der Sehbahn. So haben die Xanthophylle Lutein und Zeaxanthin neuroprotektive Eigenschaften und liegen besonders in der Makula in hoher Konzentration vor (Ozawa et al. 2012; Neelam et al. 2017). An der Aufrechterhaltung der neuroprotektiven Umgebung sind darüber hinaus die RPE-Zellen, die wie oben beschrieben die Versorgung und Instandhaltung der Photorezeptoren übernehmen, maßgeblich beteiligt. Durch ihre enge anatomische Beziehung können die RPE-Zellen das lokale neuroprotektive Zellmilieu für die Photorezeptoren aufrecht erhalten (Strauss 2005).

In dieser wissenschaftlichen Arbeit werden die folgenden fünf Zellmediatoren betrachtet und hier unter dem Aspekt der Neuroprotektion kurz vorgestellt. Der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) ist der Hauptfaktor der Angiogenese, das

heißt (d.h.) er ist für die Einsprossung von Blutgefäßen verantwortlich (Bhutto et al. 2006). Ebenfalls ist VEGF an der Wundheilung beteiligt (Tonnesen et al. 2000). Des Weiteren weist er Eigenschaften der Neuroprotektion auf, indem er Neurone über die Gefäßeinsprossung mit Sauerstoff (O₂) und Nährstoffen versorgt. Dies geschieht bereits in der Embryonalentwicklung (Carmeliet et al. 1996). Außerdem schützt VEGF im neuronalen Zellmodell über einen direkten anti-exzitatorischen Mechanismus wirksam gegen hypoxische Schäden (Svensson et al. 2002). Auch Motoneurone werden vor einem hypoxischen Tod geschützt (Lambrechts et al. 2003). Für Netzhautneurone gilt VEGF-A, ein Faktor der VEGF-Familie, als wichtiger Überlebensfaktor für die adaptive Reaktion nach ischämischen Verletzungen (Nishijima et al. 2007).

Der *Pigment Epithelial-Derived Factor* (PEDF) hemmt als Gegenspieler des VEGF die Angiogenese (Bhutto et al. 2006), d.h. er hat anti-angiogene Eigenschaften, und hemmt insbesondere die choroidale Neovaskularisation (CNV) (Mori et al. 2001). Darüber hinaus verfügt er jedoch über weitere Eigenschaften, da er u.a. an der Induktion neuronaler Ausdifferenzierung beteiligt ist (Tombran-Tink et al. 1991). Im Hinblick auf Neuroprotektion bietet PEDF im Mausmodell einen Schutz vor der Apoptose von Photorezeptoren über anti-apoptotische, entzündungshemmende und anti-angiogene Signalwege (Wang et al. 2013). Weiterhin wurden neuroprotektive Eigenschaften für retinale Ganglienzellen nachgewiesen (Pang et al. 2007). So wird PEDF u.a. von Gliazellen ausgeschüttet und schützt retinale Ganglienzellen vor einem hypoxischen Insult (Unterlauff et al. 2012). Der Schutz der retinalen Ganglienzellen erfolgt möglicherweise über die Unterdrückung von Caspase 2, ein Enzym, welches eine zentrale Rolle im Apoptosesignalweg spielt (Vigneswara u. Ahmed 2019).

Weiterhin untersucht werden der *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) und der *Nerve Growth Factor* (NGF), welche zu der Gruppe der Neurotrophine gehören. BDNF wirkt insbesondere durch den Schutz bestehender Neuronen und Synapsen neuroprotektiv und stimuliert deren Wachstum und Weiterentwicklung (Colucci-D'Amato et al. 2020). Darüber hinaus hat BDNF im Tiermodell zu der Untersuchung des Glaukoms bei intravitrealer Anwendung neuroprotektive Eigenschaften für retinale Ganglienzellen gezeigt (Chen u. Weber 2001). NGF wirkt ebenfalls an der Stabilisierung bestehender Synapsen und zusätzlich an der Regeneration peripherer Nerven mit, indem er mit weiteren Wachstumsfaktoren für eine Aussprossung der Neurone sorgt (Li et al. 2020b). Weiterhin besteht die Hypothese, dass eine

Dysregulation dieser Neurotrophine ein wichtiger Bestandteil von Erkrankungen wie dem Glaukom oder der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) ist (Telegina et al. 2019).

Weiterhin wird die Ausschüttung des *Transforming Growth Factor beta* (TGF- β) näher beleuchtet. TGF- β hat ebenfalls einige neuroprotektive Eigenschaften. So wird das Überleben und die Integrität von Neuronen unterstützt. Das Fehlen von TGF- β 1, einer Unterform von TGF- β , verschlimmert die neuronale Schädigung im Mausmodell während der Entwicklung oder nach exzitotoxischen Läsionen, möglicherweise aufgrund einer verringerten trophischen Unterstützung (Brionne et al. 2003). Außerdem wird TGF- β sowohl bei Verletzungen des zentralen Nervensystems als auch bei der Schädigung peripherer Nerven vermehrt ausgeschüttet (Li et al. 2017). Darüber hinaus hat TGF- β essentielle Funktionen in der aktiven Unterdrückung des Immunsystems, indem es auf verschiedene Immunzellen wie T-Zellen, natürliche Killerzellen und Leukozyten wirkt (Mantel u. Schmidt-Weber 2011).

TGF- β spielt jedoch auch eine zentrale Rolle in der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) (Kalluri u. Weinberg 2009). Der Prozess der EMT bezeichnet den Übergang von Epithelzellen, wie beispielsweise RPE-Zellen, in Zellen der mesenchymalen Gruppe, wie zum Beispiel (z.B.) Myofibroblasten (Kalluri u. Weinberg 2009). Wenn es im Rahmen der EMT zu einer Umwandlung der RPE-Zellen kommt, können diese ihrer Versorgungsaufgabe für die Photorezeptoren nicht mehr nachkommen, sodass es zum Absterben dieser kommt.

1.2 Altersabhängige Makuladegeneration (AMD)

Im folgenden Abschnitt wird die AMD vorgestellt, da die in dieser Arbeit durchgeführten wissenschaftlichen Untersuchungen in die Suche nach Therapieoptionen für diese Erkrankung eingebettet werden. Neuroprotektive Wirkmechanismen könnten für den Erhalt der Neuroretina, deren Zellen im Rahmen der AMD degenerieren, begünstigend wirken.

1.2.1 Epidemiologie und die Auswirkungen für die Gesellschaft

Durch den demographischen Wandel, der aus einer erhöhten Lebenserwartung resultiert, kommt es zu einem weltweiten Altern der Bevölkerung (Weltgesundheitsorganisation 2015). Somit nehmen altersabhängige Erkrankungen sowie die daraus resultierenden Folgen zu und erhalten einen zunehmend wichtigeren Stellenwert in der Gesellschaft und damit auch in der Medizin. Die AMD als altersabhängige Erkrankung verzeichnet mit zunehmendem Alter einen exponentiellen Anstieg der Prävalenz (Li et al. 2020a). Aktuell liegt diese für alle AMD-Formen zusammengerechnet, von Li et al. 2020 aus mehreren Metaanalysen ermittelt, in Europa für die über 60-Jährigen bei 27,7 % (Li et al. 2020a). Gestaffelt nach Altersgruppe zeigt sich ein Anstieg der Prävalenz mit zunehmendem Alter: von 9,6 % bei den unter 64-Jährigen über 20 % bei den 65- bis 74-Jährigen bis hin zu 33,3 % bei den über 75-Jährigen (Li et al. 2020a). Für Deutschland liegen die ermittelten Prävalenzen noch etwas über den europäischen Zahlen: so sind es bereits 13,6 % bei den unter 64-Jährigen, 24,4 % bei den 65- bis 74-Jährigen und 40,9 % bei den über 75-Jährigen (Li et al. 2020a). Außerdem gilt die AMD als häufigste Erblindungsursache in der industrialisierten Welt in der Bevölkerungsgruppe der über 65-Jährigen (Schrader 2006).

Bedingt durch den weiter voranschreitenden demographischen Wandel wird in den nächsten Jahren die sozioökonomische Relevanz der Erkrankung und somit die Bedeutung für die Gesellschaft in Deutschland sowie allen anderen Industrienationen weiter zunehmen (Schrader 2006). So ist eine Zunahme der Prävalenz um 15 % und der Inzidenz um 75 % bis in das Jahr 2050 zu erwarten (Li et al. 2020a). Bisher gibt es keine adäquate kausale Therapie der Erkrankung. Aufgrund der gesellschaftlichen Relevanz, der reduzierten Lebensqualität und der mit der Erkrankung verbundenen Einschränkungen für den einzelnen Patienten, steht die AMD im Fokus der aktuellen experimentellen und klinischen Forschung. Diese Arbeit ist an der Untersuchung neuer Therapieansätze für die frühen Stadien der AMD beteiligt.

1.2.2 Ätiologie und klinische Klassifikation

Ätiologisch liegt der AMD eine Degeneration der Photorezeptoren im Bereich der Makula zugrunde. Diese ist die Folge verschiedener Umbauprozesse im Komplex aus RPE, BrM und Choroidea, wodurch die Versorgung der Photorezeptoren mit

Nährstoffen und der Abtransport von Schadstoffen eingeschränkt wird. Als gesicherte Risikofaktoren gelten Alter, Rauchen (Pons u. Marin-Castaño 2011; Erke et al. 2014) und eine genetische Prädisposition (Fritsche et al. 2016). Als weitere Risikofaktoren werden fettreiche Ernährung, arterielle Hypertonie, Atherosklerose (Erke et al. 2014) oder Umwelteinflüsse, wie beispielsweise eine intensive Sonneneinstrahlung (Sui et al. 2013), vermutet und diskutiert.

Die Pathogenese der AMD ist multifaktoriell und noch nicht vollständig verstanden. Für die Veranschaulichung der einzelnen Komponenten wird ein Säulenmodell verwendet, welches in Abb. 2 dargestellt wird. Es lassen sich vier große Bereiche abteilen, welche alle einer fünften Einflussgröße, dem oxidativen Stress, unterliegen (siehe auch Abb. 2).

Dazu zählen der Lipidstoffwechsel, Veränderungen im Bereich der EZM, die Inflammation und die (Neo-)Angiogenese (Fritsche et al. 2016; Tode et al. 2018). Im Bereich des Lipidstoffwechsels kommt es insbesondere bei fettreicher Ernährung zu lipidhaltigen Ablagerungen von Stoffwechselendprodukten zwischen RPE und BrM (Curcio 2018). Diese werden Drusen genannt (Curcio et al. 2011) und lassen sich in der Funduskopie nachweisen. Durch das Vorhandensein dieser Drusen wird ein Entzündungsreiz gesetzt (Datta et al. 2017), außerdem entsteht vermehrt oxidativer Stress (Klettner 2012). Somit interagieren die verschiedenen Bereiche miteinander und verstärken sich gegenseitig. Der in der Fovea durch hohe Stoffwechselaktivität vermehrt entstehende oxidative Stress führt u.a. zu einer Oxidation der eingelagerten Fette, was die Entzündungsreaktionen begünstigt (Curcio et al. 2011).

Betrachtet man die Veränderungen, die sich im Bindegewebe der EZM abspielen, nimmt die Durchlässigkeit der BrM wie bereits vorangehend beschrieben physiologisch mit steigendem Alter ab (Lee et al. 2015), sodass Transportvorgänge erschwert werden (siehe auch 1.1.2). Die erschwerten Diffusionsbedingungen durch die Verdickung der BrM werden durch den Einfluss der Drusen noch aggraviert (Curcio et al. 2011). Die Kombination aus lipidreichen Ablagerungen, einer reduzierten Durchlässigkeit der BrM und dem Verlust von Schutzmechanismen des RPE vor oxidativem Stress führt zu vermehrtem oxidativen Stress (Klettner 2012) und setzt damit einen Reiz für die Einwanderung von Entzündungszellen (Kauppinen et al. 2016). Dadurch kommt es zu einer Entzündungsreaktion, die als dritte Säule zu der AMD-Pathogenese gehört. Die Inflammation steht ebenfalls in Verbindung zum Verlust der RPE-Schutzmechanismen vor oxidativem Stress (Klettner 2012). Durch oxidative

Schäden verursachte Entzündungen spielen eine wichtige Rolle in der AMD-Pathogenese (Hollyfield et al. 2008). Die Ablagerungen in der BrM und die Inflammation bedingen eine gestörte und erschwerte Sauerstoffdiffusion über die BrM (Lee et al. 2015). Infolgedessen kommt es zu einer anhaltenden Hypoxie, welche zu einer pathologischen VEGF-Ausschüttung führt (Shweiki et al. 1992). Somit kommt es als vierte Säule bei der exsudativen Form der AMD zu einer Einsprossung von Blutgefäßen, den CNV. Diese pathologischen Gefäße sind undicht, sodass es zu Ödemen und Einblutungen kommt. Im Bereich der Makula ist die Retina im physiologischen Zustand gefäßfrei (Lüllmann-Rauch u. Asan 2019), um den visuellen Eindruck nicht zu trüben. Durch die Ödeme und Einblutungen geht die CNV mit einer massiven und progredienten Visusabnahme einher.

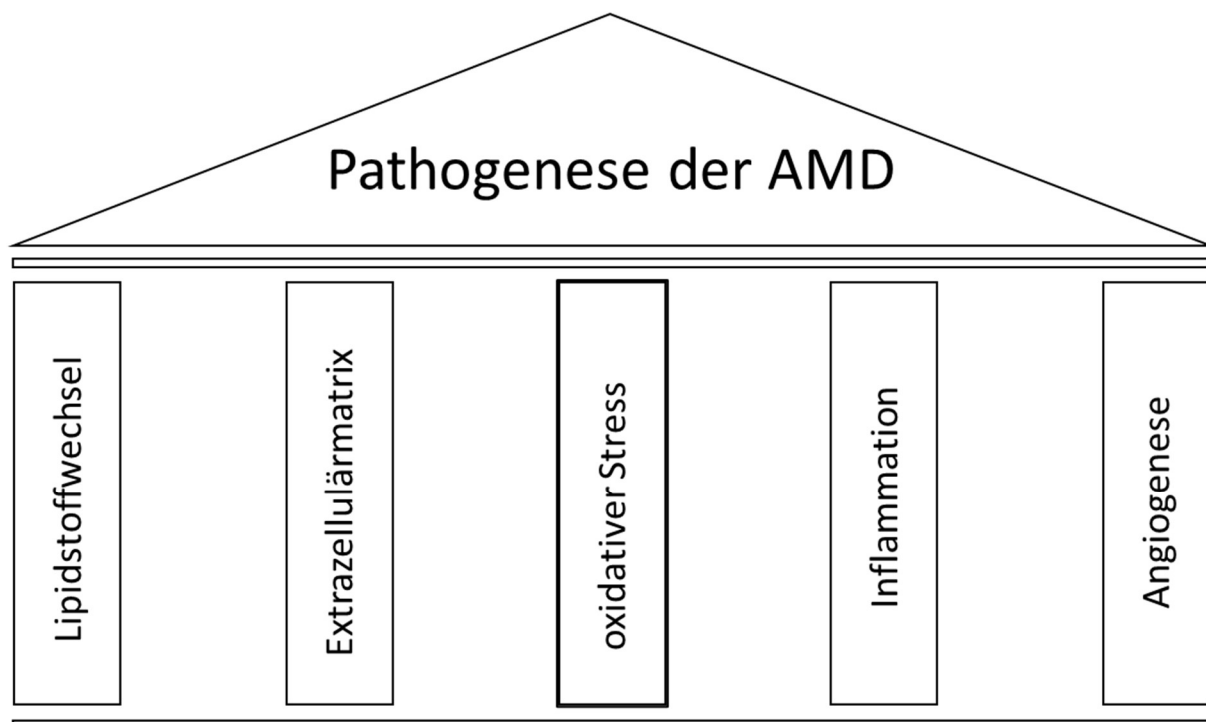


Abbildung 2: Säulenmodell der Pathogenese der Altersabhängigen Makuladegeneration (AMD). In diesem Modell werden zentrale Säulen der AMD-Pathogenese dargestellt. Der oxidative Stress interagiert als zentraler Einflussfaktor mit den vier anderen Säulen und spielt somit in der Pathogenese eine entscheidende Rolle. Auch die anderen Säulen interagieren untereinander. So wirkt sich der Lipidstoffwechsel durch Ablagerungen auf die Extrazellulärmatrix aus und zeigt darüber hinaus einen direkt begünstigenden Einfluss auf die Inflammation. Die Inflammation kann durch ein verändertes Milieu die Angiogenese triggern.

Klinisch lässt sich die AMD anhand von funduskopischen Befunden in vier Stadien unterteilen: die frühe Form, ein intermediäres Zwischenstadium und zwei späte

Formen (Ferris et al. 2013). Die beiden späten Formen sind die trockene (nicht-exsudative) und die feuchte (exsudative) Form. Bei der exsudativen Form kommt es zu einer Ausbildung pathologischer und undichter Blutgefäße. Somit bildet sich ein Ödem aus und es kann im Verlauf zu Einblutungen kommen. Diese Veränderungen führen zu einem plötzlichen und ausgeprägten Visusverlust im Bereich des zentralen Sehens, der schnell progredient ist. Dementsprechend imponieren in der Funduskopie, der Spiegelung des Augenhintergrundes, neben den Drusen auch die CNV und in schweren Verläufen zudem sub- und intraretinale Blutungen. Therapeutisch behandelt man diese VEGF-induzierten Neovaskularisationen (Ferrara 2016) mit intravitrealen Injektionen von VEGF-Inhibitoren wie Ranibizumab (Chong 2016), Aflibercept (Heier et al. 2012) oder Bevacizumab (*off-label use* / nicht zugelassen) (Ferrara u. Adamis 2016; Martin et al. 2011). Diese intravitreale Anti-VEGF-Therapie verlangsamt das Fortschreiten und kann zu einer Visusverbesserung führen (Ferrara u. Adamis 2016). Es handelt sich aufgrund des oben beschriebenen Pathomechanismus jedoch nicht um eine kausale, sondern nur um eine symptomatische Therapie. Daher ist eine wiederholte Durchführung notwendig, allerdings können die Intervalle zwischen den Injektionen bei Verbesserung des Befundes vergrößert werden (Framme et al. 2020). Trotz der konsequenten Behandlung kommt es häufig im Verlauf - nach circa (ca.) sieben Jahren - zu einer fibrotischen Veränderung der Fovea oder zu einer Vergrößerung von Atrophiearealen, da die Ursache der Erkrankung nicht behoben werden kann (Bhisitkul et al. 2015). Außerdem geht der durch die Behandlung gewonnene Visusgewinn häufig wieder verloren (Bhisitkul et al. 2015). Von der exsudativen, schnell voranschreitenden Form sind ca. 15 % der Patienten betroffen. Im Gegensatz zu der feuchten Form steht bei der trockenen, nicht-exsudativen Form die Atrophie im Vordergrund. Es kommt nicht zu pathologischen Gefäßeinsprossungen mit einhergehender Ödembildung oder Einblutungen und daher ist diese Form in Bezug auf den Visusverlust weniger schnell progredient als die exsudative Form. Von der nicht-exsudativen Form sind ca. 85 % der Patienten betroffen. Jedoch kann die nicht-exsudative Form jederzeit in eine exsudative Form der AMD übergehen, weshalb eine engmaschige Überwachung der Patienten u.a. mittels Funduskopie indiziert ist. In der Funduskopie imponieren bei der nicht-exsudativen Form im Gegensatz zu den Neovaskularisationen und retinalen Blutungen bei der exsudativen Form vor allem Drusen und atrophe Areale (Ferris et al. 2013). Das Endstadium der nicht-exsudativen Form wird als geographische Atrophie bezeichnet (Ferris et al. 2013). Leider gibt es

derzeit noch keine kausale Therapie für die nicht-exsudative Form der AMD. In der *Age Related Eye Disease Study* (AREDS) ist der Einfluss von Nahrungsergänzungsmitteln (Vitamin C, Vitamin E, Betacarotin und Zink) auf den Verlauf einer AMD untersucht worden. Es hat sich gezeigt, dass es für bestimmte Patientengruppen (Nichtraucher, ausgedehnte Drusen mittlerer Größe, mindestens eine große Druse, nicht zentraler geografischer Atrophie in einem oder beiden Augen oder fortgeschrittener AMD oder Sehverlust aufgrund von AMD in einem Auge) den Verlauf der AMD positiv beeinflussen kann (AREDS Report Nr. 8 2001). Ansonsten gibt es keine effektiven therapeutischen Ansätze für die trockene, nicht-exsudative Form der AMD. Da sich insbesondere auch frühe Stadien gut und risikoarm mittels Funduskopie feststellen lassen, wäre eine kausale Therapieoption ein großer individueller und gesamtgesellschaftlicher Gewinn und würde die Prognose vieler Patienten immens verbessern.

Beide Spätformen und insbesondere deren Endstadien gehen mit einem den Alltag einschränkenden Visusverlust einher, der in der Regel den Verlust der Lesefähigkeit und eine fehlende Gesichtserkennung beinhaltet und somit die Lebensqualität der Patienten stark beeinträchtigt (Taylor et al. 2016).

1.2.3 Relevante Zellmediatoren der Altersabhängigen Makuladegeneration (AMD)

Insbesondere die Faktoren VEGF und PEDF sind in der Pathogenese der AMD von Bedeutung, da sie maßgeblich die Angiogenese beeinflussen können (Bhutto et al. 2006). Somit sind sie in dieser Arbeit in zweifacher Hinsicht relevant: zum einen als Komponente der AMD-Pathogenese, zum anderen auch im Hinblick der Neuroprotektion für den Schutz der Photorezeptoren. VEGF spielt eine tragende Rolle in der Pathogenese der exsudativen AMD, da eine pathologische VEGF-Induktion zu einer Ausbildung der CNV führt (Spilsbury et al. 2000). Die pathologische VEGF-Ausschüttung wird u.a. durch Hypoxie (Shweiki et al. 1992), oxidativen Stress (Klettner 2012) oder Entzündungsmediatoren (Kauppinen et al. 2016) ausgelöst.

Als natürlicher Gegenspieler des VEGF hat der anti-angiogen wirkende Faktor PEDF ebenfalls eine wichtige Aufgabe in Bezug auf die AMD-Pathogenese (Bhutto et al. 2006). So verhindert PEDF die Ausbildung von CNV im Mausmodell (Mori et al. 2001). Oft ist PEDF jedoch unter pathologischen Bedingungen erniedrigt, sodass das

Gleichgewicht zwischen pro- und anti-angiogenen Faktoren empfindlich gestört ist (Bhutto et al. 2006).

Die Faktoren BDNF und NGF haben als Neurotrophine keine direkte Einwirkung auf die AMD-Pathogenese. Allerdings können der Verlust bzw. die Dysregulation als verstärkender Einfluss einer AMD gesehen werden (Telegina et al. 2019), da sich so der Untergang der Photorezeptoren beschleunigen könnte. Eine gesteigerte Sekretion könnte den Zelluntergang der Photorezeptoren im Rahmen der AMD hemmen.

1.2.4 Neuroprotektion als therapeutischer Ansatz der Altersabhängigen Makuladegeneration (AMD)

Der Erhalt und die Verbesserung eines neuroprotektiven Zellmilieus in der Umgebung der Photorezeptoren kann als mögliche therapeutische Option der AMD gesehen werden. Durch optimierte Umgebungsbedingungen für die Zellen der Neuroretina und die Reduktion von oxidativem Stress können die Photorezeptoren länger erhalten bleiben, da das Risiko ihres Absterbens gemindert werden würde. Neuroprotektion wird als Verteidigungsmechanismus verstanden, der den neuronalen Zelltod verhindern oder verzögern kann und die neuronale Funktion nach einer erfolgten Beeinträchtigung aufrechterhalten soll, wodurch im Konkreten ein Verlust des Sehvermögens vermieden wird (Rapino et al. 2018). Da es neben der AMD weitere Erkrankungen wie *Retinitis pigmentosa*, das Glaukom oder die diabetische Retinopathie gibt, die mit einer Degeneration der Photorezeptoren einhergehen, sind neuroprotektive Ansätze wichtiger Bestandteil der aktuellen Forschung nach Behandlungsmöglichkeiten. In Tiermodellen und klinischen Studien werden bereits zahlreiche neuroprotektive Therapieansätze für Netzhauterkrankungen erforscht.

Im folgenden Abschnitt werden exemplarisch neuroprotektive Therapieansätze für die in dieser Arbeit untersuchten Faktoren vorgestellt. Im okulären Hypertonie-Modell für die Simulation eines Glaukoms hat sich gezeigt, dass die VEGF-Signalübertragung eine wichtige Rolle der endogenen Reaktion auf neuronale Schäden ist (Foxton et al. 2013). In Zusammenhang mit dem Schutz von Photorezeptoren nach ischämischer Schädigung (Nishijima et al. 2007) und dem Schutz von neuronalen Zellen vor dem hypoxischen Zelltod (Svensson et al. 2002; Lambrechts et al. 2003), könnte VEGF eine grundlegende Rolle beim Schutz der retinalen Ganglienzellen spielen (Foxton et al. 2013) und daher eine therapeutische Option für das Glaukom darstellen.

PEDF bietet im Mausmodell einen Schutz vor der Apoptose von Photorezeptoren (Wang et al. 2013) und hat sich als neuroprotektiv für retinale Ganglienzellen herausgestellt (Pang et al. 2007; Unterlauff et al. 2012; Vigneswara u. Ahmed 2019). Bei der diabetischen Retinopathie hat sich PEDF ebenfalls in Bezug auf den Verlauf als begünstigender Faktor herausgestellt (Zhu u. Zou 2012).

Die Dysregulation von BDNF und NGF scheint ein wichtiger Bestandteil von Erkrankungen wie dem Glaukom oder der AMD zu sein (Telegina et al. 2019). BDNF konnte im Tiermodell für die Untersuchung des Glaukoms bei intravitrealer Anwendung neuroprotektive Eigenschaften für retinale Ganglienzellen zeigen (Chen u. Weber 2001). Es gibt Ansätze dafür, dass BDNF in Zukunft als lokales Therapeutikum für neurodegenerativ bedingte Taub- oder Blindheit genutzt werden könnte (Khalin et al. 2015). Darüber hinaus gilt BDNF durch den Erhalt dopaminerger Neurone als potentiell therapeutisches Mittel für den Morbus Parkinson, eine neurodegenerative Erkrankung des ZNS, die zum Untergang dopaminerger Neurone führt (Palasz et al. 2020). Rekombinant hergestelltes NGF hat sich im Tiermodell bei topischer Anwendung als protektiv für retinale Ganglienzellen und ihre Axone erwiesen, nachdem es zu einer Sehnervenschädigung gekommen war (Guo et al. 2020).

1.3 Laserverfahren

Laserverfahren sind eine denkbare Möglichkeit, um die RPE-Zellen zu beeinflussen. In dieser Arbeit wird untersucht, wie sich schonende Laserverfahren auf die RPE-Zellen auswirken und ob sich diese als präventive Maßnahme oder Therapieoption für die trockene Form der AMD und insbesondere auch der Frühstadien eignen.

1.3.1 Lasertherapie in der Augenheilkunde

Die Behandlung von Patienten mit verschiedenen Laserverfahren hat insbesondere in der Augenheilkunde eine lange Tradition. LASER ist eine Abkürzung und steht für *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, was ins Deutsche übersetzt Lichtverstärkung durch stimulierte Emission von Strahlung bedeutet. Im Regelfall wird das Licht zu einem monochromatischen, parallel verlaufenden Lichtstrahl gebündelt. Die verschiedenen Lasertypen unterscheiden sich in der Wellenlänge (λ) der

ausgesendeten Lichtstrahlen und in ihrem Energiegehalt (Kneubühl u. Sigrist 2008). Ein Laser besteht aus einem Lasermedium, einer Pumpe und einem Resonator (siehe auch Abb. 3). Das Lasermedium erfüllt eine Verstärkerfunktion und kann ein Gas, eine Flüssigkeit oder ein Feststoff sein. Die Pumpe dient dazu, um Energie in das Lasermedium zu bringen. Diese Energie führt daraufhin zum Übergang von Atomen in ein anderes Energieniveau. Die dabei freigesetzte Energie in Form von Photonen kann ebenfalls Atome zum Übergang in ein anderes Energieniveau bringen. Diese Anregung der Atome nennt man auch stimulierte Emission (Kneubühl u. Sigrist 2008). Der Resonator wird benötigt, um das Licht auszurichten und zu bündeln. Dieser besteht aus gegenüberliegenden Spiegeln, welche sich an den Enden des Lasermediums befinden (siehe auch Abb. 3), und verstärkt das Laserlicht durch konstruktive Interferenz. Einer der Spiegel ist teildurchlässig, sodass das Licht durch diesen hindurch austreten kann (Kneubühl u. Sigrist 2008).

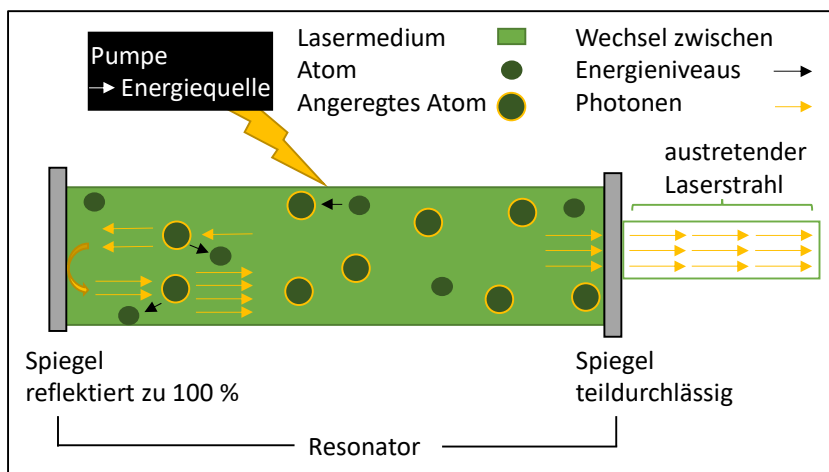


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Lasers. Ein Laser (Abkürzung für: *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) besteht aus einem Lasermedium, einer Pumpe, welche als Energiequelle dient und einem Resonator, ein System aus Spiegeln, von denen einer teildurchlässig ist. Die Pumpe regt die Atome des Lasermediums an, sodass diese auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Angeregte Atome können wiederum andere Atome anregen (stimulierte Emission). Die entstehende Energie in Form von Photonen wird durch den Resonator ausgerichtet und gebündelt. Durch den teildurchlässigen Spiegel kann der Laserstrahl austreten.

Mit verschiedenen Laserverfahren konnten bereits unterschiedlichste Behandlungsoptionen in der Ophthalmologie etabliert werden. So lässt sich beispielsweise durch laserchirurgische Abtragung von Hornhautlamellen die optische Brechungseigenschaft der Hornhaut verändern, um Refraktionsanomalien dauerhaft zu korrigieren. Des Weiteren konnten Laserverfahren in der Netzhautchirurgie

erfolgreich eingesetzt werden, um Gefäße zu veröden oder ein Ablösen der Retina zu verhindern. In der Regel werden für die Laserbehandlung der Retina Wellenlängenbereiche des sichtbaren grünen Lichtes ausgewählt, wie z.B. 532 Nanometer (nm). Hierbei wird das Energieniveau so hoch gewählt, dass es zu deutlich sichtbaren Läsionen der Retina kommt (Roider 2006). Diese konventionellen Laserbestrahlungen führen fast immer zu einer Schädigung der Neuroretina durch eine thermische Nekrose mit einhergehender Funktionseinschränkung im bestrahlten Bereich und einer späteren Narbenbildung. Dies ist bei der Behandlung einer Netzhautablösung ein gewünschter Effekt, der die Retina wieder fixiert. Eine solche Therapie ist jedoch im Bereich der Makula und insbesondere im Bereich des schärfsten Sehens, der *Fovea centralis*, durch die massive Gewebeschädigung nicht möglich.

Auf molekularbiologischer Ebene spielt das RPE für die Wirkweise der Behandlung eine entscheidende Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass die RPE-Zellen durch ihre Pigmentierung besonders gut Licht aus dem grünen Wellenbereich absorbieren (Roider 2006). Die in dieser Arbeit untersuchten Laserverfahren liegen mit 532 nm im grünwelligen Spektralbereich und zielen damit auf das RPE, welches wie bereits erläutert eine tragende Rolle in der AMD-Pathogenese einnimmt. Im Unterschied zu etablierten Laserbehandlungen erzeugen sie jedoch keine thermische Nekrose, sodass ein Einsatz im Bereich der Makula, dem Ort der Pathologie, denkbar wäre. Beide Verfahren werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt und näher erläutert.

1.3.2 Selektive Retinatherapie (SRT)

Die Selektive Retinatherapie (SRT) ist ein Laserverfahren, welches auf der selektiven Zerstörung der RPE-Zellen beruht. Die Zerstörung der RPE-Zellen wird durch kurze, repetitive Pulse eines 532 nm Laser im grünen Spektralbereich generiert. Die Dauer der Pulse liegt im Mikrosekunden (μ s) - Bereich, was die SRT von anderen Verfahren unterscheidet. Hierbei entsteht keine thermische Energie. Die technischen Einzelheiten des in dieser Arbeit verwendeten Lasers werden unter 3.3.1 aufgeführt. Durch die Laserpulse entstehen Mikroblasen in den Melanosomen der RPE-Zellen, was zu einer Ruptur der Zellmembranen und damit zu einer Zerstörung der RPE-Zellen führt. Da die Neuroretina außer in RPE-Zellen keine Melanosomen enthält, wird lediglich das RPE zerstört (Brinkmann et al. 2000). Es kommt durch die Anwendung

der SRT nicht zu einer Schädigung der Neuroretina (Roider et al. 1999). Auf der basalen Seite werden die BrM und die Choroidea durch die Anwendung der SRT ebenfalls nicht geschädigt (Roider et al. 1998; Roider et al. 1999). Im Anschluss an die RPE-Zerstörung kommt es zu einer Regeneration des RPE. Dabei kommt es zu einer Migration und Proliferation der Zellen, sodass die durch den Laser entstandenen RPE-Defekte wieder verschlossen werden (Richert et al. 2018). Durch eine nachgewiesene Überexpression von Matrixmetalloproteasen (MMP) in den sich regenerierenden RPE Zellen kommt es zusätzlich zu einer Normalisierung der verdickten BrM (Tode et al. 2018, 2019).

Die Selektivität für die Zerstörung des RPE unterscheidet die SRT von anderen Laserverfahren, weshalb sie ein großes Forschungspotential auf der Suche nach Therapieoptionen der AMD aufweist. Da im Gegensatz zu anderen Laserverfahren keine thermische Energie entsteht, welche eine thermische Nekrose des Gewebes zufolge hätte, wäre eine Behandlung im Bereich der Makula denkbar.

In klinischen Studien an Diabetespatienten konnte mithilfe einer Fluoreszenzangiographie nachgewiesen werden, dass die SRT-Behandlung klinisch *in vivo* detektiert werden kann und funktionelle Analysen zeigten den Erhalt der Neuroretina (Roider et al. 1999). Die aufgeführten Eigenschaften der Behandlung sprechen für den Einsatz als Behandlungsmethode der AMD (Richert et al. 2020b). In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob darüber hinaus neuroprotektive Faktoren ausgeschüttet werden und ob der Erhalt der Neuroretina ebenfalls auf Zellmediatorebene unterstützt werden kann.

1.3.3 Thermische Stimulation der Retina (TSR)

Die Thermische Stimulation der Retina (TSR) ist ein auf Hyperthermie beruhendes Verfahren. Hierbei wird ein Dauerstrichlaser verwendet, auch *continuos wave* (cw) genannt, der das Gewebe mit längeren Impulsen im Bereich von Millisekunden (ms) bestrahlt. Die Wellenlänge des emittierten Lichts liegt mit 532 nm im grünen Spektralbereich. Weitere technische Details des in dieser Arbeit verwendeten Lasersystems finden sich unter 3.3.1. Es kommt durch die Laseranwendung zu einer Erwärmung der RPE-Zellen. Im Gegensatz zu der SRT bestrahlt die TSR das Gewebe nur im subletalen Bereich, d.h. das RPE wird nicht zerstört. Da der Laser im grünen Wellenbereich liegt, wird die Energie hauptsächlich von den RPE-Zellen

aufgenommen. Allerdings ist die Leistung der TSR-Behandlung soweit reduziert, dass es zu keiner thermischen Zerstörung der RPE-Zellen kommt, sondern lediglich zu einer Erwärmung (thermische Stimulation) (Lavinsky et al. 2016; Tode et al. 2018).

Obwohl die genaue Wirkweise des Verfahrens noch nicht verstanden ist, konnte in einer früheren Studie ein positiver Effekt der TSR auf einige retinale Erkrankungen wie die zentral seröse Retinopathie und das Makulaödem gezeigt werden (Lavinsky u. Palanker 2015; Lavinsky et al. 2016; Sramek et al. 2011) und im Mausmodell auch auf die AMD Pathologie (Tode et al. 2018).

2 FRAGESTELLUNG

Die AMD ist die häufigste Erblindungsursache bei älteren Menschen über 60 Jahre in Industrienationen und damit auch in Deutschland. Somit kommt der AMD bereits jetzt eine hohe sozioökonomische Bedeutung zu, welche sich aufgrund des demographischen Wandels innerhalb der nächsten Jahre noch vergrößern wird. Die pathologischen Prozesse spielen sich vornehmlich im Komplex aus RPE, BrM und Choroidea ab.

Auf der Suche nach geeigneten Therapieansätzen für die AMD befasst sich diese Arbeit vornehmlich mit der trockenen, nicht-exsudativen Form und hierbei vor allem mit den früh auftretenden degenerativen Veränderungen. Ergänzend zu bereits vorliegenden Charakterisierungen der Therapieansätze durch schonende Laserverfahren wie SRT oder TSR liegt das Hauptaugenmerk dieser grundlagenorientierten Untersuchungen auf einer potentiellen Neuroprotektion durch diese Behandlungen. Somit stellt sich die Frage, ob es eine protektive Wirkung der SRT oder TSR auf die Neuroretina durch apikale Ausschüttung von neuroprotektiven Faktoren aus dem RPE gibt und ob Hinweise auf eine Induktion einer erhöhten Resistenz gegen oxidativen Stress durch diese Therapien vorliegen. Die jeweiligen Laserverfahren werden in einem porcinen Organkulturmodell getestet. Die in der Kultivierung der Organkulturen gewonnenen apikalen Überstände werden dann in einem ersten Teil mithilfe von *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISA) auf den Gehalt verschiedener Zellmediatoren hin untersucht. Es werden VEGF, PEDF und TGF- β für SRT und TSR für verschieden große Behandlungsareale betrachtet. Die neurotrophen Faktoren BDNF und NGF werden ebenfalls untersucht. In einem zweiten Teil des Projektes wurde die Beeinflussung der Stressresistenz eines neuronalen Zellmodells durch die Behandlung mit diesen Organkulturüberständen charakterisiert.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Instrumente

Tabelle 1: Auflistung aller verwendeten Geräte und Instrumente

Geräte / Instrumente	Zusatzinformation	Hersteller	Firmensitz
Autoklav	Varioklav®	Thermo Fisher Scientific	Dreieich, DE
Brutschrank	Kohlenstoffdioxid (CO ₂) Inkubator	Thermo Fisher Scientific	Dreieich, DE
	<i>BB15 Water Jacketed Incubator</i>	Labotec	Göttingen, DE
Chalazionzange	Hermle 784	Hermle	Tutlingen, DE
Eismaschine	AF80	Scotsman	Milan, IT
Gefrierschränke	-20 °C Gefrierschrank	Liebherr	Kirchdorf, DE
	-80 °C Gefrierschrank	Sanyo	Moriguchi, JP
Heizplatte	Typ 12501 SO	Medax GmbH & Co. KG	Rendsburg, DE
Inkubations-schüttler	INFORS HT	Infors AG	Bottmingen, CH
Kamera	AxioCam Mrc5	Carl Zeiss	Jena, DE
Kühlschrank	4 °C	Liebherr	Kirchdorf, DE
Laser	Prototyp Experimentallaser	Carl Zeiss	Jena, DE
Mikroskop	Inverses Lichtmikroskop, Axiovert 100	Carl Zeiss	Jena, DE
Modifizierte Ussingkammer	Spezielle Anfertigung	Technische Fakultät, CAU zu Kiel	Kiel, DE
Photometer	Mikrotiterplatten-photometer, Elx800	Biostep	Jahnsdorf, DE
Pinzetten	Anatomisch, gerade und gebogen	Bausch und Lomb GmbH	Berlin, DE
Pipetten	10 µl, 100 µl, 1.000 µl	Eppendorf	Hamburg, DE
	Mehrkanalpipette 100 µl	Eppendorf	Hamburg, DE
	Ripette®	Ritter	Schwabmünchen, DE
Saugpumpe	Vacusaft comfort	Integra Bioscience	Zizers, CH

Scheren	Enukleationsschere	Bausch und Lomb	Berlin, DE
	Federschere	Karl Storz	Tutlingen, DE
Sterilbank	Sterilbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific	Dreieich, DE
Thermischer Messkopf	Thermal Power Sensor	Thorlabs	Lübeck, DE
Vortexer	VortexGenie2	Scientific Industries	Bohemia, NY, USA
Waage	Analysewaage	Kern & Sohn	Bahlingen, DE
	Feinwaage	Satorius analytic	Göttingen, DE
Waschautomat	Elx50	Biotek	Winooski, VT, USA
Wasserbad	1086	Gesellschaft für Labortechnik	Burgwedel, DE
Wippschüttler	VWR rocker	VWR	Darmstadt, DE
Zählkammer	Neubauer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG	Lauda-Königshofen, DE
Zentrifugen	Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific	Dreieich, DE
	Rotanta 460R	Hettich	Tuttlingen, DE

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Auflistung aller Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Zusatzinformation	Hersteller	Firmensitz
Einmalpasteurpipetten	Glas	Th. Geyer	Berlin, DE
Einmalspritzen	10 ml	BD (Becton, Dickinson and Company)	Heidelberg, DE
Kanülen	30 G; 0,3x13 mm	BD (Becton, Dickinson and Company)	Heidelberg, DE
Parafilm	Parafilm® M	Bemis Company	Oshkosh, WI, USA
Pipettenspitzen	100 - 1.000 µl	Sarstedt	Nümbrecht, DE
Rasierklinge	T585	Plano	Wetzlar, DE
Reagiergefäße	SafeSeal 1,5 ml	Sarstedt	Nümbrecht, DE
Ritips®	2,5 ml und 5 ml	Ritter	Schwabmünchen, DE
Serologische Pipetten	10 ml, 25 ml und 50 ml	Sarstedt	Nümbrecht, DE
Skalpelle	No. 11	Feather	Osaka, JP
Zellkulturflaschen (Flask)	T25 (25 cm² Fläche)	TPP	Trasadingen, CH

Zellkulturflaschen	T75 (75 cm ² Fläche)	Sarstedt	Nümbrecht, DE
Zellkultur-Testplatten	12-Well	Th. Geyer	Berlin, DE
	96-Well	TPP	Trasadingen, CH
Zentrifugationsröhrchen	15 ml, 50 ml	Sarstedt	Nümbrecht, DE

3.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Auflistung aller verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Firmensitz
Betaisodona	Munipharma	Limburg, DE
Biotase	Biochrom	Berlin, DE
Calcein Acetoxymethyl	AnaSpec Inc.	Freemont, CA, USA
Calciumchlorid (2mmol)	Sigma Aldrich	Steinheim, DE
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth GmbH und Co. KG	Karlsruhe, DE
Erastin	Cayman Chemical Company über Biomol	Ann Arbor MI, USA Hamburg, DE
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma Aldrich	Steinheim, DE
HCl (25 %)	Carl Roth GmbH und Co KG	Karlsruhe, DE
MTT-Pulver (Methyl-thiazolyl-tetrazolium)	Sigma Aldrich	Steinheim, DE
Natriumchlorid 0,9 % (flüssig)	Fresenius	Bad Homburg, DE
NaOH Natronlauge 10 mol/l	Bernd Kraft	Duisburg, DE
Taurin (100 µmol)	Sigma Aldrich	Steinheim, DE
TBHP (tert-Butylhydroperoxid) (70 % Lösung in Wasser)	Merk	Darmstadt, DE
Trypanblau 0,4 %	Sigma Aldrich	Steinheim, DE

3.1.4 Zellkulturmedien

Tabelle 4: Auflistung aller Zellkulturmedien und Zusätze

Zellkulturmedium	Zusatzinformation	Hersteller	Firmensitz
Calciumchlorid	2 mmol	Sigma	Steinheim, DE
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM) <i>high glucose</i>	mit Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃), D-Glucose (4,5 g/ml), ohne Phenolrot	Biochrom	Berlin, DE
Fetales Kälberserum (FCS)	Chargennummer: 10592F	Linaris	Wertheim-Bettingen, DE
Ham's F-12	mit L-Glutamin	PAA Laboratories	Pasching, AT

L-Glutamin	200 mM, <i>low endotoxine</i>	Biochrom	Berlin, DE
Phosphatgepufferte Saline (PBS) Dulbecco	10x	Biochrom	Berlin, DE
Penicillin/Streptomycin	10.000 U/ml	Biochrom	Berlin, DE
<i>Royal Park Memorial Institute</i> (RPMI) Zellkulturmedium	mit Phenolrot	Merk	Darmstadt, DE
<i>Royal Park Memorial Institute</i> (RPMI) Zellkulturmedium	ohne Phenolrot	Biochrom	Berlin, DE
Taurin	100 µmol	Sigma Aldrich	Steinheim, DE

Tabelle 5: Auflistung der Rezepturen der verwendeten Zellkulturmedien

Medium	Bestandteile	Zusatzinformation	Mengenangabe
Grund-medium (GM)	L-Glutamin	200 mM, <i>low endotoxine</i>	5 ml (ca. 1 %)
	Penicillin/Streptomycin	10.000 U/ml	10 ml (ca. 2 %)
	RPMI	ohne Phenolrot	500 ml (ca. 97 %)
Kultur-medium 1 (KM1)	FCS	Chargennummer: 10592F	50 ml (ca. 9 %)
	Penicillin/Streptomycin	10.000 U/ml	10 ml (ca. 2 %)
	RPMI	mit Phenolrot	500 ml (ca. 89 %)
Kultur-medium 2 (KM2)	FCS	Chargennummer: 10592F	25 ml (ca. 5 %)
	L-Glutamin	200 mM, <i>low endotoxine</i>	5 ml (ca. 1 %)
	Penicillin/Streptomycin	10.000 U/ml	10 ml (ca. 2 %)
	RPMI	ohne Phenolrot	500 ml (ca. 93 %)
Organkultur-medium (OKM)	Calciumchlorid	2 mmol	1 ml (ca. 0,2 %)
	DMEM	<i>high glucose</i> ohne Phenolrot	250 ml (ca. 45 %)
	FCS	Chargennummer: 10592F	50 ml (ca. 9 %)
	Ham's F12	mit L-Glutamin	250 ml (ca. 45 %)
	Penicillin/Streptomycin	10.000 U/ml	5 ml (ca. 0,9 %)
	Taurin	100 µmol	0,2 ml (ca. 0,04 %)

Der FCS-Gehalt wird in den folgenden Teilen für KM1 und OKM mit 10 % angegeben und für KM2 mit 5 %.

3.1.5 Kits für die *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISA)

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten, kommerziell erworbenen Kits für die *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISA). *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Brain-Derived Neurotropic Factor* (BDNF), *Transforming Growth Factor beta* (TGF- β)

Kitbezeichnung	Hersteller	Firmensitz
<i>Human VEGF Quantikine ELISA</i>	R&D systems	Minneapolis, MN, USA
<i>Pigment Epithelium Derived Factor Human Recombinant</i>	Novatein Biosciences	Woburn, MA, USA
<i>Total BDNF Quantikine ELISA</i>	R&D systems	Minneapolis, MN, USA
<i>Pig Beta-Nerve Growth Factor (NGF) ELISA Kit</i>	Cusabio	Houston, TX, USA
<i>TGF-β Quantikine ELISA</i>	R&D systems	Minneapolis, MN, USA

3.1.6 Software

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Software

Software	Zusatzbezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Axiovision	Rel. 4.8	Carl Zeiss	Jena, DE
Gen5	1.04.5	Biostep	Jahnsdorf, DE
Microsoft Office	Version 2016	Microsoft	Redmond, WA, USA

3.2 Methoden der Organkultur

3.2.1 Die Präparation der Organkulturen aus Retinalem

Pigmentepithel, Bruch'scher Membran und Choroidea

Für die Untersuchung der Auswirkungen der schonenden Lasertherapien SRT und TSR auf die apikale Sekretion von Zellmediatoren wurden porcine Organkulturen des Komplexes aus RPE, BrM und Choroidea hergestellt und in modifizierten Ussingkammern kultiviert (siehe auch Abb. 3). Die Präparation des dreidimensionalen Gewebekomplexes wurde mit geringfügigen Änderungen nach dem Protokoll von Treumer et al. (Treumer et al. 2012) durchgeführt. Dafür wurden frische Schweineaugen verwendet, die von nahegelegenen Schlachthöfen bezogen wurden. Es wurde auf eine Verwendung innerhalb von 4 Stunden (h) *post mortem* geachtet.

Zunächst wurden die Bulbi mit einer gebogenen Enukleationsschere von den überschüssigen Muskel- und Bindegewebsanhängen befreit. Anschließend erfolgte für 3 - 5 Minuten (min) eine äußere Desinfektion in einem 1:3 Gemisch aus Betaisodona und Natriumchloridlösung (NaCl-Lösung) mit einer Konzentration von 0,9 %. Bis zu dem Beginn der Präparation wurden die Augen in einer NaCl-Lösung (0,9 %) auf Eis gelagert. Als nächstes erfolgte eine zirkuläre Öffnung des Bulbus entlang des *Limbus corneae* mithilfe einer Rasierklinge und einer gebogenen Enukleationsschere. Das abgetrennte anteriore Augensegment mitsamt der Linse wurde verworfen. Der Glaskörper wurde ebenfalls entfernt. Anschließend wurde ein seitlicher Einschnitt vom Sklerarand bis hin zum *Nervus opticus* gesetzt, um den posterioren Augenanteil zu präparieren. Der Komplex aus RPE, BrM und Choroidea wurde mit einer Federschere und einer gebogenen Pinzette von der Sklera abgelöst. Anschließend wurde die untere Hälfte des Ringsystems (weißer Ring) der modifizierten Ussingkammer unter das Explantat geschoben (siehe auch Abb. 4a). Mithilfe der Pinzette wurde danach die Neuroretina vom Komplex aus RPE, BrM und Choroidea abgehoben und verworfen, ohne das Explantat selbst zu berühren. Der obere Teil (schwarzer Ring) des Ringsystems wurde auf das RPE aufgelegt (siehe auch Abb. 4b). Mit einer Chalazionzange wurden die beiden Ringhälften ineinander gedrückt, um so das Gewebeexplantat zu fixieren (siehe auch Abb. 4c).



Abbildung 4: Präparation von Organkulturen aus frischen porcinen Augen. Es wurde der Komplex aus Retinalem Pigmentepithel (RPE), Bruch'scher Membran (BrM) und Choroidea von der Sklera abpräpariert und der untere Ring (weiß) des Fixierungssystems untergelegt (a). Die Neuroretina wurde abgehoben und der obere Ring (schwarz) des Fixierungssystems aufgelegt (b). Anschließend wurde das Gewebe durch das Zusammendrücken der Ringe mit einer Chalazionzange fixiert (c).

Das Ringsystem hat eine Höhe von 1 Millimeter (mm) und einen Innendurchmesser von 7 mm. Damit bietet es eine exponierte Gewebsfläche von 38,5 Quadratmillimetern

(mm²). Der eingeklemmte Fixationsstreifen zwischen den Ringen hat eine Breite von 1 mm.

Nach der Präparation wurden die Ringe zunächst in einer 12-Well-Kulturplatte mit jeweils 1,5 Milliliter (ml) Organkulturmedium (OKM) auf einer Heizplatte bei 37 Grad Celsius (°C) gelagert. Die Zusammensetzung des Mediums ist in Tabelle (Tab.) 5 unter 3.1.4 aufgeführt.

3.2.2 Kultivierung der Gewebeexplantate in modifizierten Ussingkammern

Die modifizierte Ussingkammer ist eine Vorrichtung, die es ermöglicht, Gewebeexplantate über mehrere Tage zu kultivieren und das basale Kompartiment von dem apikalen Kompartiment zu separieren. Eine Kammer besteht aus zwei Teilen, welche über zwei Gewindeschrauben zusammengehalten werden (siehe auch Abb. 5a). Zwischen den beiden Kammerbestandteilen wird das Explantat, im Ringsystem fixiert, eingespannt und über zwei blaue Gummidichtungen von beiden Seiten isoliert. Das Medium im apikalen Kompartiment kommt nur mit der RPE-Seite des Explantats in Kontakt, während das basale Medium nur mit der choroidalen Seite in Berührung kommt. So kann eine Differenzierung der unterschiedlichen Transport- und Stoffwechselvorgänge zwischen apikal und basal erfolgen (siehe auch Abb. 5b).

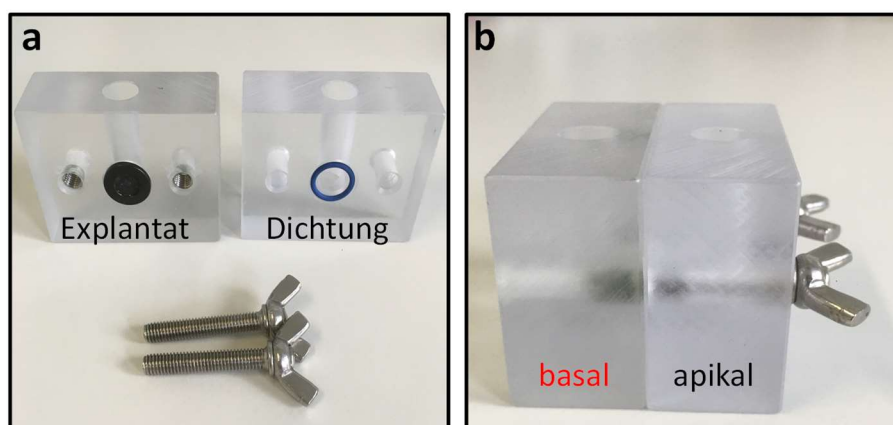


Abbildung 5: Kultivierung in der modifizierten Ussingkammer. Die Organkulturen wurden für die Dauer der Kultivierung in modifizierte Ussingkammern eingespannt (a). Diese ermöglichten eine Unterscheidung zwischen basaler und apikaler Proteinsekretion (b).

Das Einspannen der Organkulturen erfolgt unter der Sterilbank (Thermo Fischer Scientific, Dreieich). Nach dem Einbringen des Ringes in die Kammer und der Arretierung der Befestigungsschrauben erfolgt die Befüllung der beiden Kammerkompartimente mittels zweier Pipetten (Eppendorf, Hamburg) zeitgleich, um den mechanischen Stress auf das Gewebe durch verschiedene Druckverhältnisse möglichst zu verhindern. Dazu wurden 1,1 ml warmes OKM langsam und gleichmäßig simultan in beide Kammerseiten gegeben. Im Anschluss wurden die oberen Kammeröffnungen mit einem Parafilmstreifen verschlossen, damit keine Beeinträchtigung des Gewebes aufgrund von Verdunstung des Mediums entsteht. Um dennoch eine ausreichende Belüftung zu gewährleisten, wurden pro Kammerseite zehn Belüftungslöcher mit einer sterilen Kanüle in den Parafilm eingestochen. Die Kultivierung der Organkulturen erfolgte insgesamt über drei Tage. Alle 24 h erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem, auf 37 °C angewärmtem Medium.

3.2.3 Calcein-Assay zur Bestimmung der Zellviabilität der Organkulturen

Für die Überprüfung der Integrität und Viabilität der Zellen nach Abschluss der Kultivierungszeit wurde ein Calcein-Assay durchgeführt.

Der Calcein-Acetoxymethylester (Calcein-AM) diffundiert passiv in die Zelle, da Calcein durch die Acetoxymethylester-Gruppe lipophile Eigenschaften erhält (Neri et al. 2001). Intrazellulär wird die Estergruppe durch Esterasen enzymatisch abgespalten, sodass der fluoreszierende Farbstoff Calcein vorliegt. Dieser verbleibt bei vitalen Zellen mit intakter Zellmembran intrazellulär, da ohne die Acetoxymethylestergruppe keine Diffusion mehr aus der Zelle möglich ist (Neri et al. 2001). Bei beschädigten oder abgestorbenen Zellen ist die Zellmembran hingegen nicht mehr intakt und der Fluoreszenzfarbstoff verlässt die Zelle aufgrund der beschädigten Membran. Daher verbleibt das grünfluoreszierende Calcein nur in vitalen Zellen mit intakter Zellmembran. Ebenfalls entsteht die Fluoreszenz nur bei vorhandener enzymatischer Aktivität.

Für die Färbungen der Organkulturringe wurden diese mit je 2 ml OKM und pro Ring 8 Mikroliter (µl) Calcein-AM für 30 - 45 min bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Explantate zweimal mit phosphatgepufferter Saline (PBS) gewaschen, um

den überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Es wurde aufgrund des Fluoreszenzfarbstoffes im Dunkeln gearbeitet.

Die Viabilität der Zellen wurde anschließend mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie mit dem Axiovert 100 (Carl Zeiss, Jena) bei einem Wellenlängenspektrum von $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 497/517$ nm untersucht und fotografisch festgehalten. Für die Analyse der Organkulturüberstände wurden nur Organkulturringen ausgewählt, die im Calcein-AM-Assay mindestens 90 % vitale RPE-Zellen mit grüner Fluoreszenz aufwiesen.

3.3 Laserverfahren

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von neuen Laserverfahren auf das Sekretionsmuster verschiedener AMD-relevanter Zellmediatoren unter besonderer Berücksichtigung möglicher neuroprotektiver Effekte untersucht werden. Für die Behandlung der Organkulturen wurden die Verfahren SRT und TSR verwendet. Diese sind bereits in der Einleitung unter 1.3.2 und 1.3.3 vorgestellt worden. Die wichtigsten Aspekte werden jedoch hier noch einmal aufgeführt und die beiden Verfahren einander gegenübergestellt.

Bei der SRT-Behandlung werden die RPE-Zellen selektiv zerstört, jedoch nicht die Neuroretina, die BrM und die Choroidea (Roider et al. 1998; Roider et al. 1999). Diese Selektivität kommt über durch die Laserimpulse ausgelöste Mikroblasen in den Melanosomen der RPE-Zellen zustande, welche zu einer Ruptur der Zellmembranen und damit zu einer Zerstörung der RPE-Zellen führen. Da die Neuroretina, die BrM und die Choroidea keine Melanosomen aufweisen, wird lediglich das RPE zerstört (Brinkmann et al. 2000).

Im Gegensatz zu der SRT kommt es bei der TSR nicht zu einer Zerstörung von Gewebe, sondern nur zu einer thermischen Stimulation der RPE-Zellen durch Überwärmung (Lavinsky et al. 2016; Tode et al. 2018).

3.3.1 Beschreibung des Lasersystems

Für die Experimente wurde ein Neodymium-doped:Yttrium-Aluminium-Granat (Nd:YAG) Experimentallaser verwendet. Bei dem verwendeten speziellen Prototyp handelt es sich um einen Laser aus der Visulas 532-Serie (Carl Zeiss Meditec AG,

Jena) mit einer Wellenlänge von 532 nm. Die optische Faser des Prototyps hat eine quadratische Kernfläche von 70 Mikrometer (μm). Die gewünschten Einstellungen, die für die verschiedenen Versuche erforderlich waren, konnten mithilfe eines Touchscreens am Laser eingegeben werden (siehe Abb. 6d). Für eine erleichterte Anwendung während der Laserbehandlung kann der zu behandelnde Bereich mit einem für das Auge ungefährlichen, roten Teststrahl ($\lambda = 635 \text{ nm}$) markiert werden. Der eigentliche Laserimpuls, der die eingestellten Faktoren für die Behandlung der Zellen beinhaltet, wird durch ein Fußpedal (siehe Abb. 6c) ausgelöst. Die definierte Behandlungsfläche wird im Folgenden als „Spot“ bezeichnet, unabhängig davon, ob durch die Behandlung eine Läsion entsteht. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Spotgrößen (100 μm und 200 μm) verwendet, welche an der Spaltlampe ausgewählt und eingestellt werden konnten. Die beiden Spotgrößen wurden so gewählt, da ausgetestet werden sollte, ob unterschiedlich große Behandlungsflächen einen Effekt auf die apikale Zellmediatorausschüttung aufwiesen. Sowohl für 100 μm große Spots als auch für die 200 μm großen Spots gab es bereits Ergebnisse aus früheren Studien unserer Arbeitsgruppe. Es wurden möglichst kleine Spotgrößen gewählt, da dies im Hinblick auf eine im weiteren Verlauf denkbare Behandlung der Makula bei Patientenstudien einen Vorteil darstellt. Die verschiedenen Spotgrößen konnten über einen Regler an der Spaltlampe (siehe Abb. 6e) eingestellt werden.

Der verwendete Prototyp verfügt über zwei verschiedene Lasermodi. Der gepulste Modus gibt kurze repetitive Laserpulse im μs -Bereich (300 ms Dauer, 100 Hertz (Hz), Pulslänge 1,4 μs) aus, um eine SRT-Behandlung durchführen zu können. Im *continuous wave*-Modus (cw) hingegen werden vom Laser einige Impulse im ms-Bereich (100 ms Dauer) ausgegeben, womit die TSR-Behandlung appliziert werden kann.

Für den gepulsten SRT-Modus wird die Energie E in Mikrojoule (μJ) angegeben, bei der TSR hingegen die Leistung P in Milliwatt (mW). Diese Variablen werden vor jeder Behandlung der Organkulturen mithilfe eines thermischen Messkopfes (Thermal Power Sensor, Thorlabs, Lübeck) überprüft. Die unterschiedlichen Größen Energiedichte und Leistung liegen in technischen Gegebenheiten des verwendeten Prototyps begründet.

Bei der Behandlung der Geweberinge mit 200 μm großen Spots wurden im Mittel 70 Spots/Ring appliziert. Bei der 100 μm Spotgröße wurden die Organkulturringe im Mittel mit 550 Spots/Ring behandelt. Zwischen zwei applizierten Laserspots lag jeweils eine Spotgröße Abstand.

3.3.2 Laserbehandlungen im Organkulturmodell

Für die Laserbehandlungen der Organkulturen wurden aus jedem Auge mindestens zwei Gewebeexplantate herauspräpariert (siehe 3.2.1). Eine Organkultur wurde mittels Lasertherapie behandelt, die andere Organkultur wurde als unbehandelte Kontrolle unter den gleichen Bedingungen mitkultiviert. Die Präparate wurden in 12-Well-Schalen mit jeweils 1,5 ml OKM gelagert, um sie vor Austrocknung zu schützen und um die Zellen vital zu halten. Im Regelfall verläuft der Laserstrahl an der Spaltlampe horizontal, um in das Patientenauge gelangen zu können. Bei dem für die Experimente verwendeten Prototyp wurde der Laserstrahl durch einen Spiegel im 90° Winkel nach vertikal abgelenkt, um die Organkulturen behandeln zu können (siehe auch Abb. 6b). Diese wurden in der 12-Well-Platte auf einer Metallvorrichtung unter den Laserstrahl platziert (siehe auch Abb. 7). Die RPE-Integrität wurde anhand der Spaltlampenuntersuchung sichergestellt (siehe auch Abb. 7).

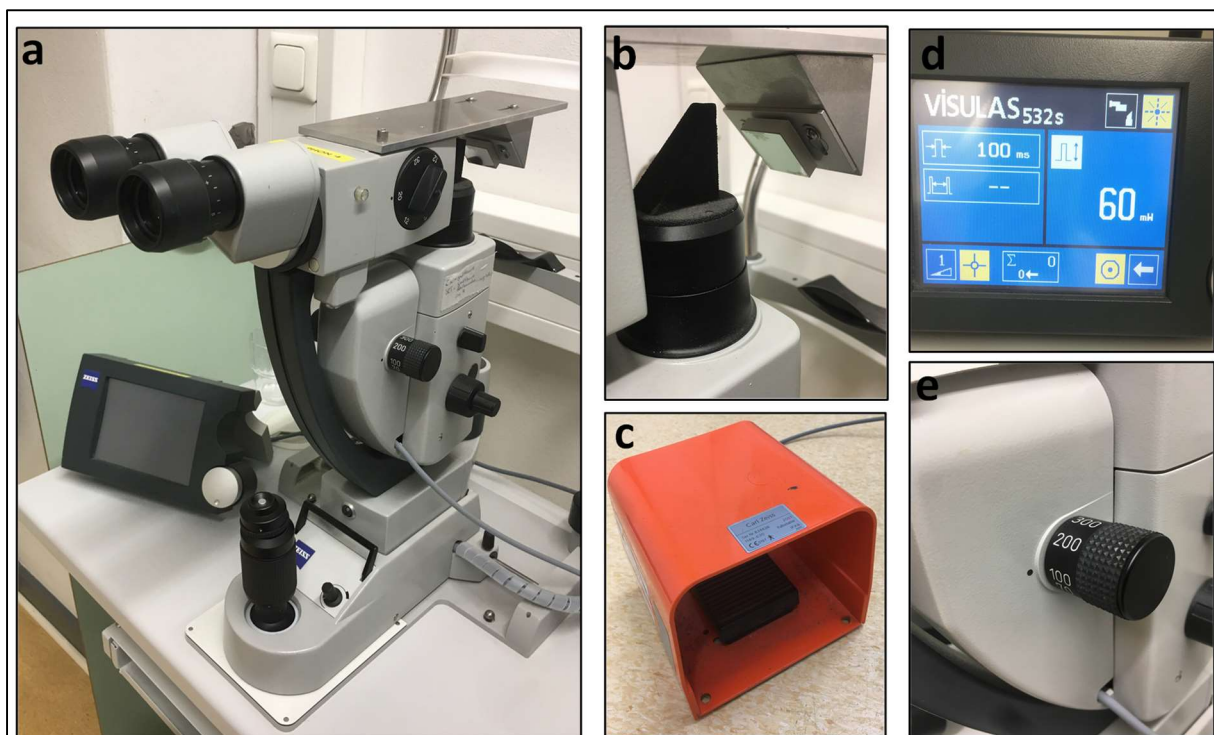


Abbildung 6: Aufbau des Lasersystems für die Behandlung der Organkulturen. Es wurde ein Neodymium-doped:Yttrium-Aluminium-Granat (Nd:YAG) Experimentallaser (Carl Zeiss Meditec AG, Jena) verwendet, welcher mit einem Spaltlampenaufsatz gekoppelt wurde (a). Über einen Spiegel konnte der aus der Spaltlampe austretende Laserstrahl um 90° senkrecht nach unten umgeleitet werden (b). Mithilfe eines Fußpedals (c) wurde der Laserimpuls ausgelöst, nachdem die gewünschten Einstellungen über einen Bildschirm (Touch-Screen) eingegeben (d) und die Größe der Spots an der Spaltlampe eingestellt wurden (e).



Abbildung 7: Laserbehandlung der Organkulturen. Die Präparate wurden in einer 12-Well-Platte mithilfe einer Spiegelapparatur unter der Spaltlampe gelasert. Die Integrität des Retinalen Pigmentepithels (RPE) wurde zuvor an der Spaltlampe überprüft.

Für die Kultivierungsversuche zum Nachweis möglicher neuroprotektiver Zellmediatoren wurden die folgenden Laserbehandlungen durchgeführt:

- a) 200 μm Spots, jeweils für SRT und TSR. Es wurden jeweils 70 Spots/Organkulturring appliziert. Dies entspricht einer Gesamtbehandlungsfläche von $2,8 \text{ mm}^2$. In Bezug auf die Gesamtfläche des Rings wurden ca. 7 % der exponierten Fläche behandelt.
- b) 100 μm Spots, jeweils für SRT und TSR. Es wurden jeweils 550 Spots/Organkulturring appliziert. Dies entspricht einer Gesamtbehandlungsfläche von $5,5 \text{ mm}^2$, sodass eine kumulativ größere Fläche behandelt wurde. In Bezug auf die Gesamtfläche des Rings wurden ca. 14 % der exponierten Fläche behandelt.

Diese Versuchsparameter wurden in Anlehnung an vorangegangene Experimente aus unserer Arbeitsgruppe gewählt, da diese Spotgrößen und Behandlungsintensitäten die vielversprechendsten Effekte im porcinen Organkulturmodell versprachen. Nach Abschluss der Laserbehandlungen wurden die Organkulturen wie oben beschrieben in modifizierte Ussingkammern eingespannt und kultiviert.

3.3.3 Titration des Zellschadens im Retinalen Pigmentepithel

Vor der eigentlichen Laserbehandlung der Organkulturen und der daran anschließenden Analyse der Zellmediatoren musste die RPE-Zellschadensschwelle

bestimmt werden. Die jeweilige Energie bzw. Leistung, welche dazu führte, dass nach 24 h 50 % der behandelten Zellen abgestorben waren, wurde als Zelltodschwelle definiert.

Diese Titration war erforderlich, um sicherzustellen, dass die Laserbehandlungen in gewünschter Weise auf die RPE-Zellen wirken. Für die SRT ist eine ausreichend hohe Energie erforderlich, um eine Zerstörung des RPE auszulösen. Die Behandlung bei der TSR sollte hingegen im subletalen Bereich liegen, damit keine Zerstörung der PRE-Zellen, sondern lediglich eine thermische Anregung resultiert.

Wie bereits erläutert wurden frische Organkulturen präpariert und in Medium in einer 12-Well-Platte unter dem Laser positioniert. Zunächst wurde ein Quadrat aus vier Markerläsionen gesetzt (siehe Abb. 8a). Diese waren stark überschwellig und daher ohne eine Färbung als geschädigter RPE-Bereich unter der Spalllampe zu erkennen. Innerhalb des Quadrates wurde dann eine Testläsion mit der definierten, zu untersuchenden Energie bzw. Leistung gelasert. Diese war mit bloßem Auge nicht mehr sichtbar. Nach Abschluss der Laserbehandlungen wurden die Organkulturen in den 12-Well-Platten für 24 h im Brutschrank kultiviert. Nach 24 h erfolgte die Färbung der Gewebeexplantate mittels Calcein-Assay (siehe auch 3.3.2). Mithilfe der markierten Bereiche durch die überschwelligen Markerläsionen konnten die Testläsionen in der Mitte des Quadrates aufgesucht und photographisch dokumentiert werden. Die Läsionen wurden semi-automatisch mit dem AxioVision-Programm ausgemessen. Eine Auswertung erfolgte in Bezug auf die maximal behandelte Fläche ($100\text{ }\mu\text{m} - 10.000\text{ }\mu\text{m}^2$ und $200\text{ }\mu\text{m} - 40.000\text{ }\mu\text{m}^2$) und wurde prozentual angegeben (siehe Abb. 8b).

Die Auswirkungen der Laserbehandlungen auf das RPE hängen von vielen unterschiedlichen Parametern ab, beispielsweise der Pigmentierung des RPE. Daher wurden auch Laserapplikationen in die Auswertung einbezogen, bei denen keine Läsion generiert wurde. So wird die Variabilität des Zelltods besser abgebildet. Der so entstandene Bereich zwischen 0 % und 100 % wird als Zelltodspanne bezeichnet, außerdem wurde der Mittelwert angegeben.

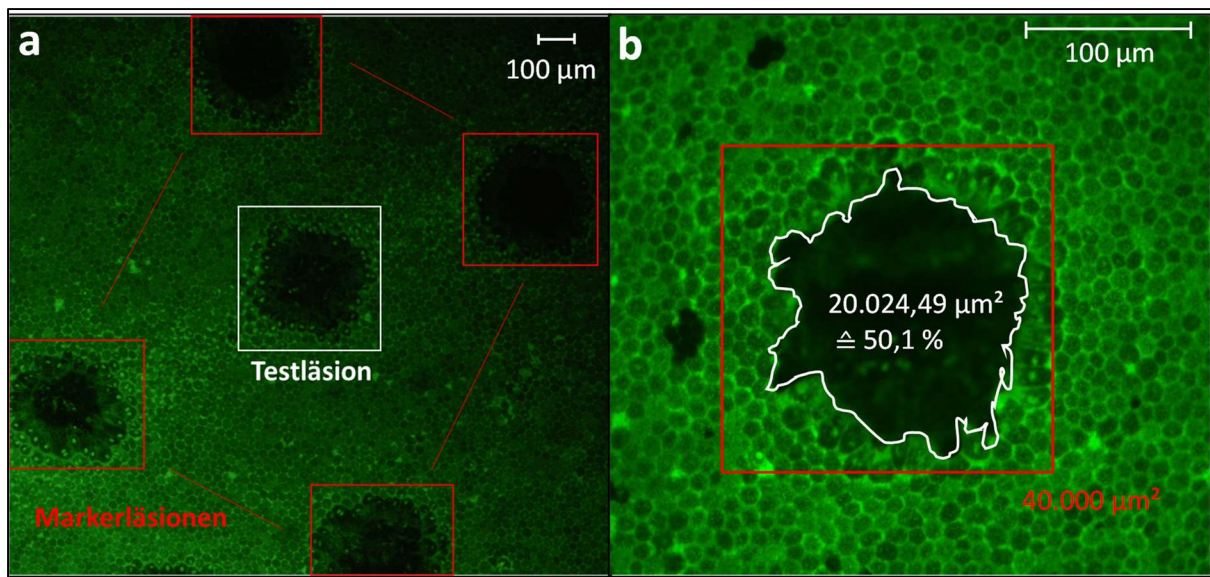


Abbildung 8: Titration des Zellschadens durch die Laserbehandlungen. (a) Es wurden überschwellige Markerläsionen (rote Kästen) gesetzt, die sofort nach der Applikation unter der Spaltlampe sichtbar wurden. Diese wurden in einem Quadrat angeordnet, um den Bereich, der die Testläsion enthält, zu kennzeichnen. Diese wurde anschließend in die Mitte der Markerläsionen appliziert (weißer Kasten). (b) Anschließend konnte der entstandene Schaden mithilfe eines halbautomatischen Messprogramms (Axiovision: Carl Zeiss, Jena) ausgemessen werden.

3.4 Gewinnung der Organkulturüberstände

Um die ausgewählten Faktoren im OKM nach der Kultivierung in einem ELISA nachzuweisen (siehe auch 3.5) oder die Versuche zu der Untersuchung einer oxidativen Stressresistenz mit der neuronalen Zellreihe der SH-SY5Y-Zellen durchzuführen, wurden die Organkulturüberstände, wie im Folgenden beschrieben, gewonnen und gelagert.

Der Mediumwechsel der modifizierten Ussingkammern erfolgte alle 24 h, um die Organkulturen ausreichend zu versorgen und die Viabilität der RPE-Zellen zu erhalten. Um mechanische Scherkräfte zu reduzieren, wurde das Medium zeitgleich aus beiden Seiten der modifizierten Ussingkammer langsam entnommen. Für die weiteren Versuche wurden die Überstände von Tag eins (nach 24 h Kultivierung) und Tag drei (nach insgesamt 72 h) verwendet. Dazu wurde das Medium in 1,5 ml Reagiergefäßen gekühlt (4 °C) bei 13000 Umdrehungen pro Minute (= rounds per minute; rpm) für 5 min zentrifugiert (Thermo Fischer Scientific, Dreieich). Die Überstände wurden in neue Gefäße überführt und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren (Liebherr, Kirchdorf).

3.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Für den Nachweis der zu untersuchenden Zellmediatoren wurden die Organkulturüberstände nach der folgenden Methode untersucht.

Ein ELISA dient zum Nachweis spezifischer Proteine mittels Farbumschlag und basiert auf Antigen-Antikörper-Reaktionen (Aydin 2015). Alle im Rahmen der Arbeit verwendeten Assays basieren auf dem Sandwich-ELISA-Prinzip. Dabei befinden sich für das Zielprotein spezifische Antikörper in den Kavitäten einer 96-Well-Platte. Nach Zugabe der Probe, in diesem Fall der Organkulturüberstände von Tag drei, wird das zu untersuchende Zielprotein durch die Bindung an die Antikörper in den Kavitäten der Platte fixiert. Nach einem Waschvorgang wird ein zweiter Antikörper hinzugegeben, der das Zielprotein an einem anderen Epitop (spezifische Bindungsregion) bindet. Nach einem erneuten Waschvorgang liegt das Zielprotein zwischen Erst- und Zweitantikörper fixiert vor (Sandwich-Prinzip). Es erfolgt daraufhin die Koppelung des Zweitantikörpers an eine Peroxidase, welche in der Lage ist ein Substrat umzusetzen. So entsteht ein Farbumschlag, der photometrisch ausgemessen werden kann. Die Intensität des Farbstoffes ist umso höher, je mehr Zielsubstanz in der Kavität an die Antikörper gebunden werden konnte. Das Prinzip eines Sandwich-ELISA ist schematisch in Abb. 9 dargestellt.

Die für die Untersuchung der Proben kommerziell erworbenen Kits sind unter 3.1.5 aufgeführt. Es wurden die Herstellerangaben für das Auftragen der Standards und der Überstände eingehalten und bei Bedarf erfolgte eine entsprechende Verdünnung der Proben vorgenommen. Die Waschschrte erfolgten beim VEGF-, BDNF- und TGF- β -ELISA in Abhängigkeit von der Herstellerempfehlung automatenbasiert am ELx50 (Biotek, Winooski, USA) Waschautomat, beim PEDF- und NGF-ELISA wurde mit einer Mehrkanalpipette (Eppendorf, Hamburg) per Hand gewaschen. Die photometrische Auswertung aller 96-Well-Platten erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450 \text{ nm}$. Mithilfe des Gen5 Programms (Biostep, Jahnsdorf) wurden die Proteinkonzentrationen automatisch über die mitgeführten Standardkurven errechnet.

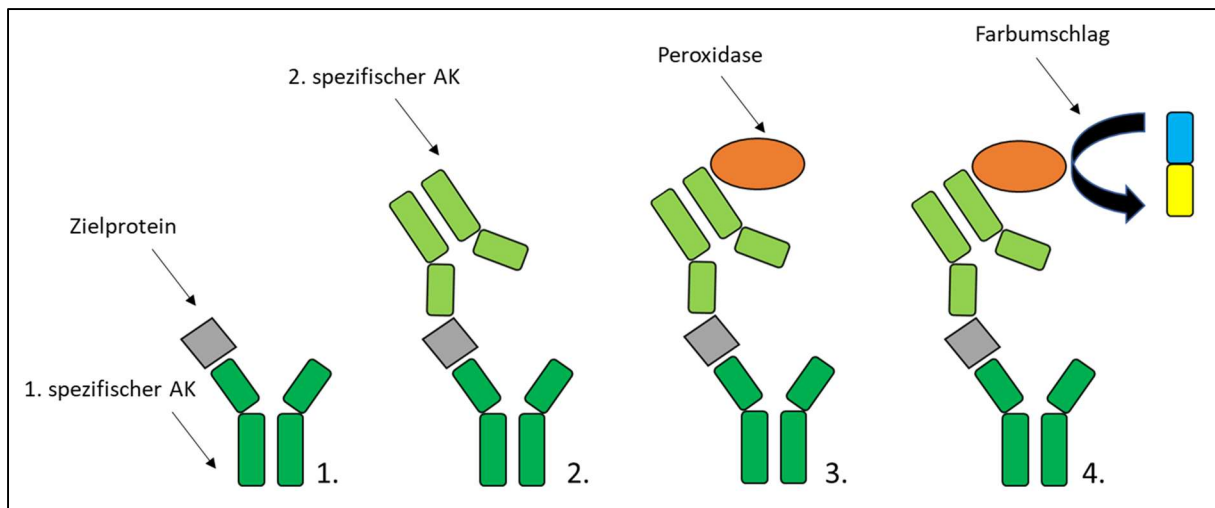


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) nach dem Sandwich-Prinzip. Bei diesem Verfahren wird das zu detektierende Zielprotein durch einen ersten spezifischen Antikörper (AK) auf der Platte gebunden (1.). Durch Zugabe eines zweiten spezifischen Antikörpers, der an eine andere Stelle des Zielproteins bindet, liegt dieses dann zwischen den beiden Antikörpern gebunden vor (2.). Daher spricht man von Sandwich-Prinzip. Mithilfe einer Peroxidase, die an den zweiten Antikörper binden kann (3.), kann ein Farbumschlag erwirkt werden (4.). In einer photometrischen Auswertung lässt sich daher auf die Konzentration der Zielsubstanz in der Probe rückschließen.

3.6 Kultivierung der SH-SY5Y Zellen

3.6.1 Die SH-SY5Y-Zelllinie als neuronales Zellmodell

Um die neuroprotektiven Ansätze untersuchen zu können, wurde sich eines neuronalen Zellmodells bedient. Die SH-SY5Y-Zelllinie entstammt einem Neuroblastom eines vierjährigen Mädchens. In einer Knochenmarkbiopsie des metastasierten neuronalen Tumors (Stadium 4) wurde zunächst die Zelllinie SK-N-SH gewonnen (Biedler et al. 1973), welche dann über Subklonierungen hin zu der SH-SY5Y-Zelllinie (dritter Subklon) verändert wurde (Biedler et al. 1978).

Die verwendete SH-SY5Y-Zelllinie ist dem Labor freundlicherweise von Frau PD Dr. Vicky Wätzig am Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein zu Verfügung gestellt worden. Dieses Institut hatte seine Zellen über das Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH bezogen. Dort sind die Zellen unter der DSZM-Nummer ACC 209 katalogisiert.

3.6.2 Auftauen der Zellen

Die bei -80 °C eingefrorenen SH-SY5Y Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und dann unter der Sterilbank in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit ca. 5 ml Kulturmedium überführt. Die Zusammensetzung des Mediums findet sich unter 3.1.4 in Tab. 5 als Kulturmedium 1 (KM1), wie es weiterhin bezeichnet wird. Das Reaktionsgefäß wurde bis auf 10 ml mit KM1 aufgefüllt und für 5 min bei 900 rpm zentrifugiert. Im Anschluss an die Zentrifugation wurde das überschüssige Medium entfernt und das Zellpellet wurde in 1 ml frischem KM1 resuspendiert. Die Zentrifugation wurde bei gleichen Bedingungen noch einmal wiederholt. Nach erneutem Resuspendieren des Zellpellets konnte die Suspension mit insgesamt 10 ml KM1 in eine Zellkulturflasche mit 25 Quadratzentimeter (cm²) großem Flaschenboden (T25 Zellkulturflasche) für die Kultivierung überführt werden. Nun wurde die Flasche im Brutschrank (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) kultiviert bis eine Konfluenz von 75 - 85 % erreicht war. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte das Passagieren der SH-SY5Y-Zellen.

3.6.3 Passagieren der Zellen

Die SH-SY5Y-Zellen wurden in Zellkulturflaschen vermehrt. Je nach benötigter Zellmenge wurden verschiedene Flaschengrößen, nämlich die oben (siehe auch 3.6.2) bereits eingeführten T25 und größere Zellkulturflaschen mit 75 cm² großem Flaschenboden (T75) verwendet. Zunächst wurde das Medium entfernt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgte mit dem Enzym Biotase (Biochrom, Berlin). Dazu wurden in die T25 Flaschen jeweils 1 ml und in die T75 Flaschen je 3 ml Biotase gegeben und die Flaschen für 3 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die abgelösten Zellen in ein Zentrifugenröhrchen mit Grundmedium (GM) ohne FCS gegeben. Die Zusammensetzung des Mediums findet sich unter 3.1.4 in Tab. 5. Das Zentrifugenröhrchen mit den abgelösten SH-SY5Y-Zellen wurde für 5 min bei 900 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 4 ml KM1 resuspendiert. Das Passagieren der Zellen erfolgte alle 48 - 72 h im Verhältnis von 1:4. In T25 Zellkulturflaschen wurden 9 ml, in die T75 Zellkulturflaschen 14 ml Medium (KM1) vorgelegt und dann jeweils 1 ml der Zellsuspension hinzugegeben. Die Zellkulturflaschen wurden dann bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. In den Zellkulturflaschen konnten in der T25

Größe ca. 4 Millionen Zellen und in der T75 Größe ca. 11,5 Millionen Zellen herangezogen werden.

3.6.4 Vorversuche für die Kultivierung der SH-SY5Y-Zellen auf 96-Well-Platten

In mehreren Vorversuchen wurde das Wachstumsverhalten der SH-SY5Y-Zellen auf 96-Well-Platten beobachtet, um das Optimum für die geplanten Versuche herauszufinden. Dafür wurden verschiedene Zellzahlen (10.000 versus (vs.) 15.000 Zellen) ausgesät und Mediumansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen (0 %, 1 %, 5 % und 10 %) von Fetalem Kälberserum (FCS) miteinander verglichen. Die Kultivierungsdauer der neuronalen Zellen auf der 96-Well-Platte lag bei 96 h, alle 48 h erfolgte ein Mediumwechsel.

3.6.5 Aussaat und Kultivierung der SH-SY5Y-Zellen auf 96-Well-Platten

Für die Versuche wurde eine definierte Zellzahl pro Well auf den 96-Well-Platten aufgebracht. Als optimale Zellzahl, um die Zellen gleichmäßig konfluent auf 96-Well-Platten zu kultivieren, hat sich in den Vorversuchen 10.000 Zellen/Well herausgestellt. Als Medium hat sich ein Ansatz mit 5 % FCS bewährt, dieses wird im Folgenden als Kulturmedium 2 (KM2) bezeichnet. Die Zusammensetzung des Mediums findet sich unter 3.1.4 in Tab. 5. Es kam unter 5 % FCS zu der gleichmäßigsten Bewachung des Bodens im Well und die Ausbildung der Differenzierungsmerkmale ging am deutlichsten und gleichmäßigsten vonstatten. Als Differenzierungsmerkmale wurden die Entwicklung einer dreieckigen Zellform, die Aussprossung von langen Zellfortsätzen (Neuriten) und die Vernetzung der Zellen untereinander mit der Ausbildung von Clustern definiert (siehe auch Abb. 9). Die Beurteilung der Differenzierung erfolgte durch visuelle Beobachtung unter dem Auflichtmikroskop. Zum Aufbringen auf die 96-Well-Platten wurden SH-SY5Y-Zellen aus Zellkulturflaschen genutzt, die innerhalb der Flasche einen gleichmäßigen Zellrasen mit einer Konfluenz von mindestens 80 % aufwiesen. Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und danach in Abhängigkeit von der Größe der Zellkulturflasche mit 1 ml oder 3 ml Biotase abgelöst. Das gewonnene Zellpellet wurde in 1.000 µl KM2

resuspendiert. Die Suspension wurde für ein erleichtertes Auszählen 1:10 verdünnt und dann zu gleichen Teilen mit Trypanblau (Sigma Aldrich, Steinheim) gemischt. Dabei handelt es sich um einen Farbstoff, der beschädigte oder abgestorbene Zellen blau anfärbt. Vitale Zellen mit einer intakten Zellmembran nehmen den Farbstoff hingegen nicht auf und leuchten im Phasenkontrast. Die Zellzählung erfolgte nach Anfärbung mithilfe der Neubauer-Zählkammer. Diese weist ein Raster mit vier Quadranten (Großquadrate) auf. Die weiß erscheinenden, vitalen Zellen innerhalb der vier Großquadrate wurden standardisiert ausgezählt (Q1-Q4). Mithilfe der unten genannten Formel (1) konnte die Zellzahl / 100 µl Suspension errechnet werden.

$$\frac{Q1+Q2+Q3+Q4}{4} * x = n \quad (1)$$

Q1 - Q4: vier Quadranten in der Neubauer-Zählkammer
 x: Verdünnungsfaktor Auszählung
 n: Zellzahl in der Suspension

Mithilfe der Zellkonzentration pro 100 µl konnte im Anschluss über die zweite Formel (2) errechnet werden, welchen Verdünnungsfaktor V_t man benötigt, um die gewünschte Zellzahl/Well zu erhalten. V_t konnte dann für die Berechnung des Anteils der Zellsuspension an der benötigten Gesamtmenge Medium genutzt werden.

$$\frac{n}{10.000} = V_t \quad (2)$$

n: Zellzahl in der Suspension
 V_t : Verdünnungsfaktor

Nun erfolgte die Berechnung der benötigten Medium-Gesamtmenge für die 96-Well-Platten (siehe auch Formel 3). Es werden nur die Innenwells für die Kultivierung der Zellen genutzt, um Platteneffekte durch die Randwells auszuschließen. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass sich die Zellen in Randwells nicht so gut ausdifferenzieren und nicht so konfluent wachsen wie Zellen in Innenwells. Daher wurden die Randwells bei den Versuchen auf den 96-Well-Platten nicht mit

einbezogen und lediglich mit jeweils 100 µl GM bestückt. Weiterhin wurde dann der erforderliche Anteil der Zellsuspension berechnet (siehe auch Formel 4).

$$w * 100\mu l + r = M \quad (3)$$

w: Anzahl der zu bestückenden Wells

r: Reserve

M: Medium Gesamtmenge

$$\frac{M}{V_t} = m \quad (4)$$

M: Medium Gesamtmenge

V_t: Verdünnungsfaktor

m: Anteil der Zellsuspension

Das Gemisch aus Zellen und Medium wurde mit einer Mehrkanalpipette in die Innenwells der 96-Well-Platten gegeben. Die Kultivierung der Platten erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank.

Nach Abschluss der Vortests wurden die SH-SY5Y-Zellen für insgesamt 96 h mit KM2 auf den 96-Well-Platten kultiviert. Dabei erfolgte alle 24 h eine lichtmikroskopische Beurteilung des Wachstumsverhaltens, der Konfluenz im Well und der Ausbildung von Ausläufern zu einer Vernetzung der Zellen untereinander (siehe auch Abb. 10). Exemplarische Wells wurden des Weiteren fotografisch dokumentiert. Alle 48 h erfolgte ein Mediumwechsel.

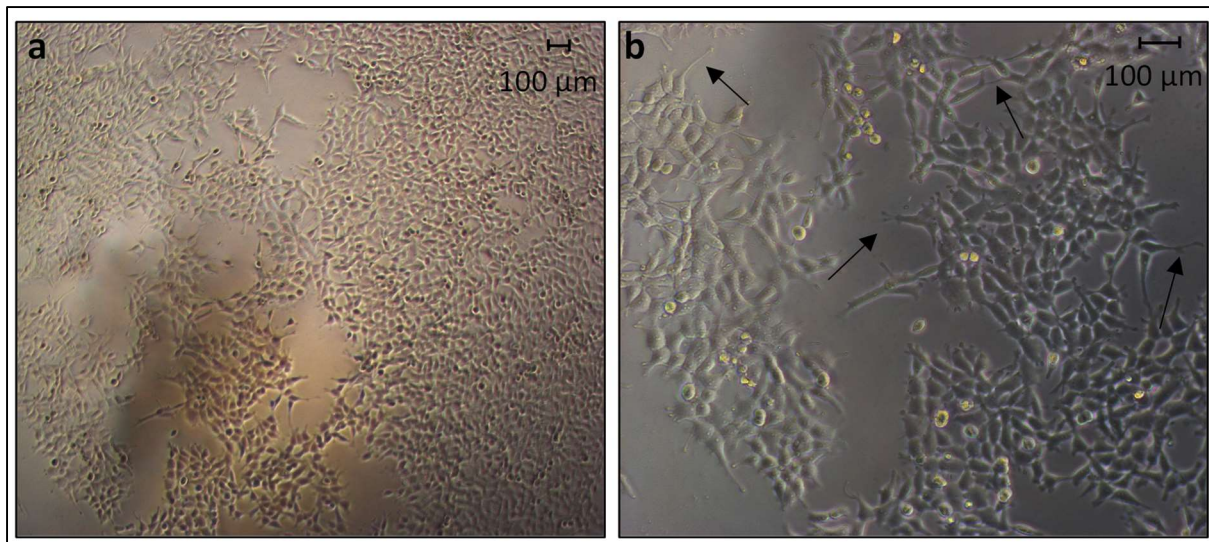


Abbildung 10: SHSY-5Y-Zellen in der Kultivierung mit Ausbildung von Differenzierungsmerkmalen. Die SH-SY5Y-Zellen wurden über 96 Stunden (h) auf 96-Well-Platten mit 5 % Fetalem Kälberserum (FCS) im Kulturmedium 2 (KM2) kultiviert, der Mediumwechsel erfolgte alle 48 h. (a) ist mit einer Vergrößerung von 50 aufgenommen. Es zeigt sich die Clusterbildung der SH-SY5Y-Zellen. (b) ist mit einer Vergrößerung von 100 aufgenommen. Die schwarzen Pfeile markieren exemplarisch die Ausläufer der SH-SY5Y-Zellen. Weiterhin zeigen die Zellen die typische, dreieckige Form als Differenzierungsmerkmal.

3.6.6 Titration der erforderlichen Stresskonzentration

Um einen möglichen neuroprotektiven Effekt der Laserverfahren auf die Zellen der Organkulturen zu charakterisieren, war es erforderlich das neuronale Zellmodell einem Stressor auszusetzen. So könnte sich eine mögliche Verbesserung des Überlebens der neuronalen Zellen nach Kultivierung mit Überständen aus mit dem Laser behandelten Organkulturen nachweisen lassen. Verglichen wurde der Effekt mit unbehandelten Organkulturen, die als Kontrollen dienten. Es wurde eine 50 %-ige Reduktion der Zellaktivität von den SH-SY5Y-Zellen im Methyl-thiazolyl-tetrazolium (MTT)-Assay (siehe auch 3.7) als ausreichender Stress definiert. Getestet wurde dabei die Stoffwechselaktivität der SH-SY5Y-Zellen als Marker für die Zellviabilität (siehe auch 3.7). Die erforderliche Konzentration des oxidativen Stresses wurde in Vortests titriert. Das Konzept des oxidativen Stresses beruht auf der Schädigung von Biomolekülen wie Desoxyribonukleinsäuren (*deoxyribonucleic acid*, DNA), Lipiden und Proteinen (Müller-Esterl 2018). Als Stressoren wurden Wasserstoffperoxid (H_2O_2), tert-Butylhydroperoxid (TBHP) und Erastin getestet. Zu der Wirkweise der verschiedenen Stressoren lässt sich festhalten, dass H_2O_2 zu den reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) gehört. Diese Gruppe wird durch eine unvollständige

Einelektronenreduktion von Sauerstoff gebildet (Park 2013). Bei TBHP kommt es zu einer Lipidperoxidation (Martín et al. 2001), weiterhin löst TBHP in Endothelzellen Apoptose und Nekrose aus (Zhao et al. 2017). Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass TBHP in neuronalen Zellen den Ferroptose-Signalweg auslöst (Wu et al. 2018). Dabei handelt es sich um eine Form des Zelltods, welche mit einer Eisenüberladung einhergeht (Dixon et al. 2012). Bei Erastin handelt es sich um einen Aktivator dieses Ferroptose-Signalwegs (Dixon et al. 2012).

Als erstes wurde untersucht, wie sich die SH-SY5Y-Zellen verhalten, wenn sie den Stressoren ohne FCS im Medium ausgesetzt sind. Dazu wurden die Zellen wie üblich für 96 h mit KM2 auf den 96-Well-Platten kultiviert. Die Stressoren wurden in verschiedenen Konzentrationen in GM angesetzt. Die ausgetesteten Konzentrationen sind in Tab. 8 aufgeführt. Nach dem Entfernen des KM2 von der 96-Well-Platte wurden die verschiedenen Stressor-Konzentrationen in GM auf die Zellen gegeben. Nach 24 h erfolgte die Auswertung der Zellreduktion durch den oxidativen Stressor mittels eines MTT-Tests.

Tabelle 8: Auflistung der Stressorkonzentrationen, welche mit dem Grundmedium (GM) ausgetestet wurden. Wasserstoffperoxid (H_2O_2), tert-Butylhydroperoxid (TBHP)

Verwendete Stressoren	Ausgetestete Konzentrationen in μM			
H_2O_2	100	250	500	1.000
TBHP	100	250	500	1.000
Erastin	1	7,5	15	30

In Abhängigkeit von den Ergebnissen der Austestung auf GM-Basis wurden weitere Konzentrationen der Stressoren TBHP und H_2O_2 in OKM auf die 96-Well-Platten gegeben. Erastin hat sich in den Vorversuchen mit GM nicht als geeigneter Stressor erwiesen, da es im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle zu einer Zunahme der Aktivität im MTT-Assay gekommen war (siehe auch 4.1.1.1 und Tab. 14). Daher wurde Erastin für weitere Austestungen nicht mehr verwendet. Für eine besseren Adaptation an den späteren Versuchsaufbau hat das OKM für 1 h oder 24 h vor der Stressorexposition auf die Zellen einwirkt. Die ausgetesteten Konzentrationen der einzelnen oxidativen Stressauslöser H_2O_2 und TBHP sind in Tab. 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Auflistung der Stressorkonzentrationen, welche mit dem Organkulturmedium (OKM) ausgetestet wurden

Verwendete Stressoren	Einwirkzeit des OKM vor Stress	Ausgetestete Konzentrationen in Mikromolar (μM)						
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	1 Stunde (h)	100	150	200	250	300	600	900
		1.200	1.500	2.100	2.250	2.400	2.500	3.500
	24 h	2.000	2.100	2.250	2.400	2.500	3.000	3.500
tert-Butylhydroperoxid (TBHP)	1 h	77	192	385	577	769	1.000	1.500
		2.000	2.500	3.000	6.000	9.000	12.000	15.000
	24 h	77	192	385	577	769		

Des Weiteren wurde ausgetestet, wie sich die vorherige Kultivierung der Zellen auf der 96-Well-Platte auf die Stressresistenz auswirkt. Dazu wurden einige Platten über 96 h mit OKM (10 % FCS) kultiviert und andere mit KM1 (10 % FCS). Diese wurden dann Standardplatten mit 5 % FCS im Kulturmedium (KM2) gegenübergestellt. Die ausgesäte Zellzahl und die Passage (Generationenalter) der SH-SY5Y-Zellen wurden konstant gehalten, ebenso die Kultivierungsbedingungen und -zeiten.

3.6.7 Zugabe der apikalen Organkulturüberstände von Tag eins und Tag drei

Für die Untersuchung der apikalen Überstände aus den Organkulturexperimenten wurden die SH-SY5Y-Zellen wie im vorangegangenen Teil beschrieben mit KM2 (5 % FCS) auf 96-Well-Platten ausgesät und dort für 96 h kultiviert. Ein Wechsel des Mediums erfolgte nach 48 h. Nach Entfernen des Mediums wurden die aufgetauten Organkulturüberstände (siehe auch 3.4) gemäß einem randomisierten Schema auf die Zellen gegeben. Als Plattenkontrolle diente OKM, welches keinen Kontakt zu RPE-Zellen hatte. Es wurden pro Lasermodus sechs Organkulturen untersucht. Dabei wirkten die Überstände entweder für 1 h oder für 24 h auf die Zellen ein, bevor oxidativer Stress durch die Zugabe von H_2O_2 induziert wurde. H_2O_2 hatte sich in den durchgeführten Stresstitrationen als am geeignetsten herausgestellt (siehe auch 4.3.2.2). Es wurde eine Reduktion der Zellaktivität im MTT auf 50 % durch den Stressor angestrebt. Die konkreten Stressorkonzentrationen wurden in den Vortests

ausgetestet und lagen bei 3.000 Mikromolar (μM) (Tag 3) und 3.500 μM (Tag 1) H_2O_2 . Die Versuche der Organkulturüberstände von Tag 1 mit der Einwirkzeit von 1 h wurden in Dreifachbestimmung, die der 24 h Einwirkzeit in Doppelbestimmung, durchgeführt. Die Versuche der Organkulturüberstände von Tag 3 wurden unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Versuche der Überstände von Tag 1 mit einer Einwirkzeit von 24 h durchgeführt. Die Inkubation mit dem oxidativen Stressor erfolgte in allen Ansätzen für 24 h. Nach Ablauf der Stressphase wurde an den Zellen ein MTT-Assay durchgeführt, um die Auswirkungen zu quantifizieren. Abb. 11 zeigt den Ablauf der durchgeführten Versuche schematisch.

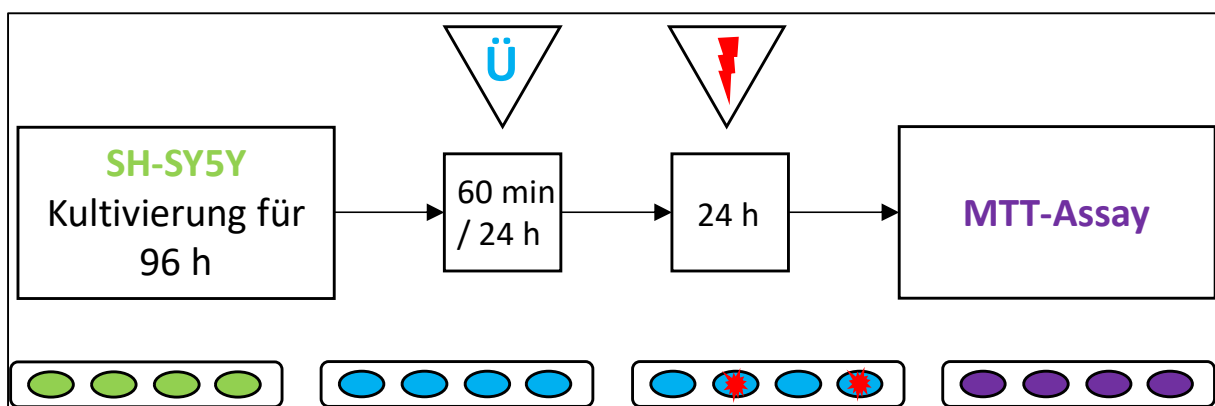


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes für die Untersuchung der Auswirkungen der Organkulturversuche auf SH-SY5Y-Zellen. Zunächst erfolgte die Kultivierung der neuronalen Zellen auf 96-Well-Platten für 96 Stunden (h) mit einem Mediumwechsel nach je 48 h. Daran schloss sich die Zugabe der gesammelten Überstände (Ü) auf das neuronale Zellmodell (SH-SY5Y-Zellen) an. Nach einer Inkubation für entweder 1 h oder 24 h folgte die Zugabe von oxidativem Stress (rot gekennzeichnet). Nach einer Inkubationszeit von 24 h erfolgte die Auswertung der Auswirkung des oxidativen Stresses auf die neuronalen Zellen in einem Methyl-thiazolyl-tetrazolium-Assay (MTT-Assay).

3.7 Methyl-thiazolyl-tetrazolium (MTT)-Assay

Dieser Assay wurde durchgeführt, um eine Aussage über die Zellaktivität der SH-SY5Y-Zellen treffen zu können.

Bei dem Farbstoff Methyl-thiazolyl-tetrazolium (MTT) handelt es sich um ein wasserlösliches, gelbes Tetrazoliumsalz. Dieses kann von vitalen Zellen aufgenommen und dann zu dem blau-violetten Formazan reduziert werden (Mosmann 1983), welches wasserunlöslich ist. Dieses geschieht in Abhängigkeit von pyridinhaltigen Reduktionsäquivalenten des Nicotinamidadenindinukleotid (NAD, reduzierte Form NADH), Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP, reduzierte

Form NADPH) und teilweise auch von Succinat. Der beschriebene Farbumschlag bildet ein Maß für die Glykolyserate der Zellen (Mosmann 1983). Daher lässt sich in diesem Assay die metabolische Aktivität bestimmen, welche als Korrelat für die Zellviabilität angesehen wird.

Für die MTT-Stammlösung wurde MTT-Pulver (Sigma Aldrich, Steinheim) in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) ohne Phenolrot in einer Konzentration von 5 Milligramm pro Milliliter (mg/ml) angesetzt und bis zu ihrem Gebrauch bei -20 °C eingefroren. Aus dieser Stammlösung wurde kurz vor dem Beginn des Assays eine MTT-Gebrauchslösung hergestellt. Dazu verdünnte man die Stammlösung mit GM der SH-SY5Y-Zellen im Verhältnis von 1:10.

Für den MTT-Assay wurden pro Well je 10 µl der Gebrauchslösung in die Wells der 96-Well-Platte hinzugegeben und die Platte für 4 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit waren violette Formazankristalle erkennbar. Im Anschluss wurde das Medium mit einem Sauger aus den Wells entfernt. Durch Zugabe von 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO; Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe) pro Well konnte eine Freisetzung des Farbstoffes aus den Zellen erzielt werden. Für eine gleichmäßige Verteilung wurden die Platten für 10 min bei 37 °C im Inkubationsschüttler (Infors AG, Bottmingen, CH) mit 200 rpm inkubiert. Die Auslesung erfolgte im Anschluss bei einer Wellenlänge von $\lambda = 550 \text{ nm}$. Für die Nullwertbestimmung wurde bei drei Randwells mit GM ohne FCS ebenfalls 10 µl MTT-Gebrauchslösung zugegeben und dieses nach dem Absaugen durch reines DMSO ersetzt.

3.8 Statistik

Die durchgeführten Experimente wurden jeweils an mindestens drei biologischen Replikaten wiederholt. Die Anzahl dieser Wiederholungen für die einzelnen ELISA sind in Tab. 10 aufgeführt.

In den Balkendiagrammen im Ergebnisteil ist der Mittelwert als x-faches der Kontrolle mit der entsprechenden Standardabweichung (STABW) angegeben. In der Unterschrift der Abbildungen findet sich ebenfalls die Anzahl der Replikate aus Tab. 10 als $n = x$ angegeben. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der zweiseitige t-Test nach Student herangezogen und mithilfe von Microsoft Office Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) durchgeführt. Es wurde für die ELISA-Ergebnisse

jeweils gepaart gegen die unbehandelte Kontrolle gerechnet, da die Kontrolle aus dem gleichen Auge stammen. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert unter 0,05 ($p < 0.05$) angesehen und durch einen Signifikanzstern (*) gekennzeichnet. Die t-Tests im Rahmen der Versuche mit dem neuronalen Zellmodell der SH-SY5Y-Zellen wurden ungepaart gegen die entsprechende Kontrolle gerechnet. Dabei wurden für jeden untersuchten Lasermodus sechs Wiederholungen durchgeführt. Nach 1 h Einwirkzeit wurden die einzelnen Proben jeweils in Dreifachbestimmung aufgetragen, nach 24 h Einwirkzeit in Doppelbestimmung. Die dazugehörigen Balkendiagramme enthalten ebenfalls die Mittelwerte in %, die entsprechenden STABW und Signifikanzsterne (*) für $p < 0.05$.

Tabelle 10: Anzahl der Wiederholungen der *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISA). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF), Brain-Derived Neurotropic Factor (BDNF), Nerve Growth Factor (NGF), Transforming Growth Factor beta (TGF- β)

ELISA		Anzahl der Wiederholungen	Proben aufgetragen in...
VEGF	SRT 100 μm	10	Doppelbestimmung
	SRT 200 μm	9	Doppelbestimmung
	TSR 100 μm	9	Doppelbestimmung
	TSR 200 μm	8	Doppelbestimmung
PEDF	SRT 100 μm	10	Doppelbestimmung
	SRT 200 μm	11	Doppelbestimmung
	TSR 100 μm	10	Doppelbestimmung
	TSR 200 μm	9	Doppelbestimmung
BDNF	SRT 200 μm	8	Doppelbestimmung
NGF	SRT 200 μm	4	Einzelbestimmung
	TSR 200 μm	3	Einzelbestimmung
TGF- β	SRT 100 μm	10	Doppelbestimmung
	SRT 200 μm	10	Doppelbestimmung
	TSR 100 μm	9	Doppelbestimmung
	TSR 200 μm	9	Doppelbestimmung

4 ERGEBNISSE

4.1 Titration des Zellschadens durch die Laserbehandlungen

Im Fokus dieser Arbeit stehen die Auswirkungen der stimulierenden Laserbehandlungen auf den Gewebeverband aus RPE, BrM und Choroidea. Daher ist eine genaue Titration der Energiedichte bzw. Leistung der Laserbehandlungen von essentieller Bedeutung, um die Intensität der Bestrahlung und die daraus resultierende Zellschädigung zu charakterisieren. Beide verwendeten Laserverfahren sollen keinen neuroretinalen Schaden erzeugen. Dies kann allerdings in dieser Arbeit nicht beurteilt werden, da nur der Komplex aus RPE, BrM und Choroidea untersucht wird. Bei der SRT ist eine Schädigung der RPE-Zellen erwünscht. Bei der TSR-Behandlung soll das RPE hingegen intakt bleiben und lediglich thermisch stimuliert werden. Im Folgenden finden sich die Ergebnisse der Schwellentitration für die verwendeten Laserverfahren. Als Zelltodspanne wurde der Bereich zwischen 0 % und 100 % toter Zellen im gelaserten Bereich angegeben. Außerdem wurde der Mittelwert der abgestorbenen Gewebebereiche pro Energie bzw. Leistung errechnet. Für 100 µm Spots wurde 10.000 µm² als maximal behandelte Fläche gleich 100 % gesetzt, bei den 200 µm Spots entsprachen 40.000 µm² 100 %. Die beiden unterschiedlichen Spotgrößen wurden gewählt, um die Auswirkungen der Laserbehandlung für verschiedene Parameter zu untersuchen. Außerdem gibt es bereits einige Daten aus Vorarbeiten, sodass eine Orientierung für die Auswahl der Spotgrößen möglich war (Richert et al. 2018; Tode et al. 2018, 2019). So sollten viele kleine Spots (100 µm) gegen wenige große (200 µm) verglichen werden. Daher ist die Titration für beide Spotgrößen erforderlich.

4.1.1 Titration des Zellschadens nach Selektiver Retinatherapie

Die SRT führt zu einer selektiven Zerstörung der RPE-Zellen, wohingegen BrM und Choroidea erhalten bleiben. Die Titration des Zellschadens erfolgte für die SRT für die Spotgrößen 100 µm und 200 µm und wurde mittels einer Calceinfärbung (siehe auch 3.3.2) nach 24 h durchgeführt. Diese Färbung der vitalen Zellen war erforderlich, da der erzeugte Schaden für die Titration unter der Spaltlampe mit den Augen nicht zu erkennen war. Für die SRT wird die Energiedichte in mJ/cm² angegeben. Die gewählte

Einheit Energiedichte ist auf technische Limitationen des verwendeten Prototyps zurückzuführen (siehe auch 3.3.1). Das Ziel der Titration ist ein Zellschaden von ca. 50 %. Folgende Daten wurde bereits in Richert et al. (Richert et al. 2021) veröffentlicht.

4.1.1.1 100 µm Spotgröße

Die Schwellentitration der SRT-Behandlung mit 100 µm Spots (Tab. 11) führte nach 24 h zu folgendem prozentualen Zelltod: Eine Energiedichte von 150 mJ/cm² führte zu einem mittleren Absterben der Zellen von 16 %. Die Zelltodspanne reichte von 0 % bis 45 %. Die Erhöhung der Energiedichte auf 180 mJ/cm² erzeugte einen mittleren Schaden von 29 % bei einer Zelltodspanne zwischen 0 % und 81 %. Bei einer Energiedichte von 205 mJ/cm² lag ein mittlerer Schaden von 53 % vor und die Zelltodspanne reichte von 10 % bis 98 %. 230 mJ/cm² Energiedichte erzeugte im Mittel eine Schädigung von 56 %. Die Zelltodspanne lag zwischen 27 % und 95 %. Die Energiedichte von 260 mJ/cm² erreichte im Mittel einen Zelltod von 73 % bei einer Zelltodspanne von 36 % bis 100 %. Eine Energiedichte von 305 mJ/cm² erzeugte eine mittlere Schädigung von 91 % bei einer Zelltodspanne von 52 % bis 100 %.

4.1.1.2 200 µm Spotgröße

Für die 200 µm großen Spots (Tab. 11) ist bei einer Energiedichte von 120 mJ/cm² ein mittlerer Schaden von 6 % entstanden. Die Zelltodschwelle lag zwischen 0 % und 43 %. Bei einer Energiedichte von 140 mJ/cm² ergab sich ein mittlerer Schaden von 47 % bei einer Zelltodspanne von 0 % bis 100 %. Für eine Energiedichte von 180 mJ/cm² lag der mittlere Schaden bei 97 %. Die Zelltodspanne reichte von 26 % bis 100 %.

Tabelle 11: Titration des Zellschadens nach Behandlung der Organkulturen mit der Selektiven Retinatherapie (SRT)

100 µm Spotgröße						
Energiedichte in mJ/cm ²	150	180	205	230	260	305
Ausgewertete Läsionen	75	79	97	37	85	57
Zelltodspanne in %	0 - 45	0 - 81	10 - 98	27 - 92	36 - 100	52 - 100
Mittelwert in %	16	29	54	56	73	91

200 µm Spotgröße			
Energiedichte in mJ/cm ²	120	140	180
Ausgewertete Läsionen	76	62	57
Zelltodspanne in %	0 - 43	0 - 100	26 - 100
Mittelwert in %	6	47	97

Für die SRT-Behandlung der Organkulturen wurden anhand der erfolgten Titration die folgenden Energiedichten für die Behandlung festgelegt: bei den 100 µm Spots wurde mit 205 mJ/cm² behandelt, bei den 200 µm Spots mit 140 mJ/cm². Beide Energiedichten führten mit 54 % und 47 % zu einem ca. 50 %-igen Zellschaden im Bereich der behandelten Fläche.

4.1.2 Titration des Zellschadens nach Thermischer Stimulation der Retina

Die Titration des Zellschadens für die TSR wurde für 100 µm und 200 µm nach 24 h ebenfalls mit einer Calceinfärbung durchgeführt. Genauso wie für die SRT wurde kein Schaden erzeugt, der eine sichtbare Läsion induzierte. Für die TSR wird im Unterschied zu der SRT Behandlung (Energiedichte in mJ) die Leistung in mW angegeben, welches in den technischen Spezifikationen des Prototyps begründet liegt (siehe auch 3.3.1). Ziel der Titration ist ein möglichst geringer Zellschaden, der jedoch nicht 0 % ist. Somit wird sichergestellt, dass eine Behandlung der Zellen im subletalen Bereich stattfindet. Ein Teil der folgenden Daten wurde bereits in Richert et al. (Richert et al. 2021) veröffentlicht.

4.1.2.1 100 µm Spotgröße

Die TSR-Behandlung mit 100 µm großen Testläsionen (Tab. 12) führte bei einer Leistung von 12 mW zu einem mittleren prozentualen Schaden von 4 %. Die Zelltodspanne reichte von 0 % bis 21 %. Für 15 mW Leistung ergab sich ebenfalls ein mittlerer Schaden von 4 %. Die Zelltodspanne lag jedoch zwischen 0 % und 29 %. Ein mittlerer prozentualer Schaden von 44 % wurde nach einer Behandlung mit 25 mW Leistung erzeugt. Die Zelltodspanne ist mit 17 % - 93 % anzugeben. Bei einer Leistung

von 35 mW ergab sich ein mittlerer prozentualer Schaden von 92 % und die Zelltodspanne reichte von 55 % bis 100 %.

4.1.2.2 200 µm Spotgröße

Für die 200 µm großen Spots (Tab. 12) ist nach Behandlung mit 22 mW Leistung ein mittlerer Schaden von 4 % entstanden. Die Zelltodspanne reichte von 0 % bis 49 %. Eine Leistung von 40 mW führte zu einem mittleren prozentualen Schaden von 38 %. Die Zelltodspanne lag zwischen 3 % und 88 %. Durch die Behandlung mit 60 mW Leistung konnte ein mittlerer Schaden von 63 % erzeugt werden. Bei dieser Leistung reichte die Zelltodspanne von 19 % bis zu 100 %.

Tabelle 12: Titration des Zellschadens nach Behandlung der Organkulturen mittels Thermischer Stimulation der Retina (TSR)

100 µm Spotgröße				
Leistung in mW (100 ms)	12	15	25	35
Ausgewertete Läsionen	48	50	81	91
Zelltodspanne in %	0 - 21	0 - 29	17 - 93	55 - 100
Mittelwert in %	4	4	44	92
200 µm Spotgröße				
Leistung in mW (100 ms)	22	40	60	
Ausgewertete Läsionen	61	66	76	
Zelltodspanne in %	0 - 44	3 - 88	19 - 100	
Mittelwert in %	5	38	63	

Für die TSR-Behandlung der Organkulturen wurden anhand der durchgeführten Titration die folgenden Einstellungen für die Behandlung festgelegt: bei den 100 µm Spots wurde mit 12 mW behandelt, da eine Behandlung der Organkulturen mit 15 mW zu einer größeren Zelltodspanne und sichtbaren Spotläsionen führte und daher die Leistung weiter auf 12 mW reduziert wurde. Bei den 200 µm Spots erfolgte die Behandlung mit 22 mW. Somit war eine Behandlung der Organkulturen und damit des RPE im subletalen Bereich möglich.

4.2 Sekretion neuroprotektiver Zellmediatoren nach Laserbehandlung

4.2.1 Ausschüttung des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Der Einfluss der schonenden Laserverfahren SRT und TSR auf die apikale VEGF-Ausschüttung wird im folgenden Abschnitt dargestellt. Dabei wurden die beschriebenen Behandlungsweisen verwendet und unterschiedliche Spotgrößen miteinander verglichen. VEGF ist pro-angiogen und weist darüber hinaus neuroprotektive Eigenschaften auf (siehe auch 1.1.4). Der Faktor wurde mittels ELISA-Verfahren (siehe auch 3.1.5 und 3.5) nachgewiesen, wird als x-faches der unbehandelten Kontrolle (\pm STABW) angegeben und in Abb. 12 dargestellt. Das verwendete reine OKM enthielt in den ausgetesteten Proben kein VEGF.

4.2.1.1 Behandlung mittels Selektiver Retinatherapie

Nach der Behandlung mit 100 μ m Spots zeigte sich an Tag drei kein Unterschied der apikalen VEGF-Ausschüttung im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (0,95-faches der Kontrolle \pm 0,52). Die Organkulturen, welche mit 100 μ m Spots behandelt wurden, schütteten zwischen 203,2 Pikogramm (pg)/ml und 966,6 pg/ml VEGF aus, im Mittelwert 481,7 pg/ml (\pm 231,1 pg/ml). Die entsprechenden Kontrollen lagen zwischen 224,5 pg/ml und 1028,5 pg/ml VEGF mit einem Mittelwert von 517,8 pg/ml (\pm 212,2 pg/ml). Für eine Behandlung mit 200 μ m Spots ergab sich hingegen eine signifikante VEGF-Reduktion auf das 0,84-fache im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle ($p < 0.05$, \pm 0,17). Somit zeigten die ELISA-Untersuchungen, dass es in Abhängigkeit von der Spotgröße zu einer Reduktion der VEGF-Ausschüttung nach apikal kam (siehe Abb. 12a). Bei den 200 μ m Spots schütteten die Organkulturen zwischen 279,8 pg/ml und 666,3 pg/ml VEGF aus, im Mittelwert 472,5 pg/ml (\pm 107,7 pg/ml). Die entsprechenden Kontrollen lagen zwischen 430,4 pg/ml und 743,1 pg/ml VEGF mit einem Mittelwert von 560,9 pg/ml (\pm 86,6 pg/ml).

4.2.1.2 Behandlung mittels Thermischer Stimulation der Retina

Die Ergebnisse für die 100 μ m Spotgröße wurden bereits in Richert et al. 2020 (Richert et al. 2020b) veröffentlicht. Nach der Behandlung der Organkulturen mit der TSR ergaben sich an Tag drei sowohl für die 100 μ m Spots (0,87-fache der Kontrolle,

$\pm 0,28$) als auch für die 200 μm Spotgröße (1,02-fache der Kontrolle, $\pm 0,26$) keine signifikanten Veränderungen der VEGF-Ausschüttung nach apikal im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Die Organkulturen, welche mit 100 μm Spots behandelt wurden, schütteten zwischen 154,0 pg/ml und 820,2 pg/ml VEGF aus, im Mittelwert 474,9 pg/ml ($\pm 197,4$ pg/ml). Die entsprechenden Kontrollen lagen zwischen 233,6 pg/ml und 1239,8 pg/ml VEGF mit einem Mittelwert von 615,4 pg/ml ($\pm 362,9$ pg/ml). Bei den 200 μm Spots schütteten die Organkulturen zwischen 145,1 pg/ml und 944,6 pg/ml VEGF aus, im Mittelwert 502,5 pg/ml ($\pm 239,9,3$ pg/ml). Die entsprechenden Kontrollen lagen zwischen 343,7 pg/ml und 609,5 pg/ml VEGF mit einem Mittelwert von 497,6 pg/ml ($\pm 82,9$ pg/ml). Somit wurde die VEGF-Ausschüttung in Richtung der Neuroretina von der TSR-Behandlung nicht signifikant beeinflusst (siehe Abb. 12b).

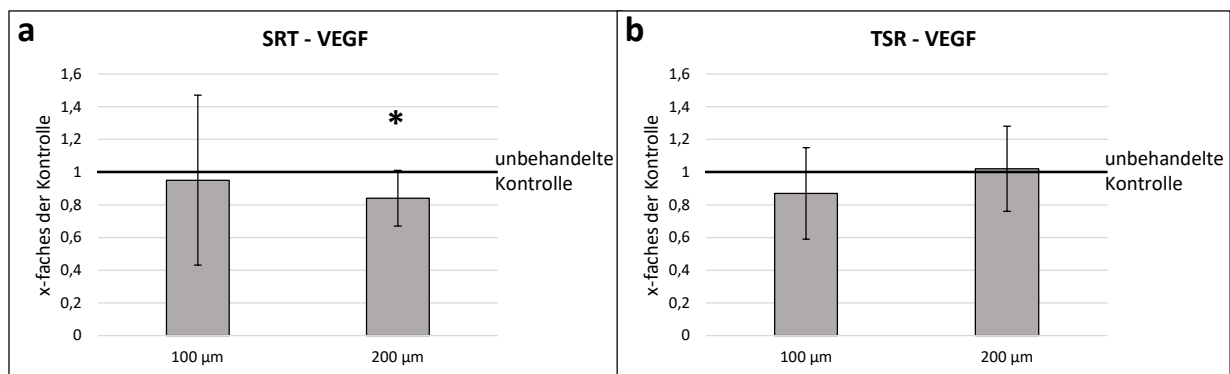


Abbildung 12: Ausschüttung des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in den apikalen Überständen an Tag drei nach Behandlung der Organkulturen mit Selektiver Retinatherapie (SRT) und Thermischer Stimulation der Retina (TSR). (a) zeigt die Ausschüttung von VEGF nach Selektiver Retinatherapie mit 100 μm ($n = 10$) und 200 μm ($n = 9$) Spots. Für 200 μm zeigte sich ein signifikanter Rückgang (durch * markiert, $p < 0.05$) der apikalen VEGF-Ausschüttung im Vergleich zu der nicht gelaserten Kontrolle (schwarze Linie). Die Daten wurden bereits in Papenkort et al. publiziert (Papkort et al. 2021). In (b) finden sich die Ergebnisse für die apikale VEGF-Ausschüttung nach Thermischer Stimulation der Retina (100 μm $n = 9$; 200 μm $n = 8$) nach Richert et al. (Richert et al. 2020b) und Papenkort et al. (Papkort et al. 2021). Hierbei ergaben sich keine signifikanten Ergebnisse.

4.2.2 Ausschüttung des Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF)

Der folgende Abschnitt erläutert, welche Auswirkungen die schonenden Laserverfahren SRT und TSR auf die apikale PEDF-Ausschüttung der Organkulturen nach Kultivierung über drei Tage hatten. Für den Nachweis wurde das ELISA-Verfahren (siehe auch 3.1.5 und 3.5) herangezogen. PEDF ist der anti-angiogene

Gegenspieler von VEGF, weist jedoch ebenfalls Eigenschaften der Neuroprotektion auf. Die Werte werden als x-faches der unbehandelten Kontrolle (\pm STABW) angegeben und in Abb. 13 dargestellt. Wie für VEGF wurden ebenfalls die zwei verschiedenen Spotgrößen miteinander verglichen.

4.2.2.1 Behandlung mittels Selektiver Retinatherapie

Die Behandlung mit 100 μ m der SRT führte für PEDF an Tag drei zu einer signifikanten Induktion auf das 1,21-fache der Kontrolle ($p < 0.05$, $\pm 0,08$). Die behandelten Organkulturen schütteten zwischen 96,8 Nanogramm (ng)/ml und 135,9 ng/ml PEDF aus mit einem Mittelwert von 113,4 ng/ml ($\pm 12,2$ ng/ml). Die entsprechenden Kontrollen lagen zwischen 82,7 ng/ml und 115,4 ng/ml, im Mittelwert 93,6 ng/ml ($\pm 10,9$ ng/ml). Jedoch enthielt OKM auch 105,1 ng/ml PEDF. Die 200 μ m Spots ergaben an Tag drei ebenfalls eine signifikante Erhöhung der PEDF-Ausschüttung nach apikal auf das 1,16-fache der unbehandelten Kontrolle ($p < 0.05$, $\pm 0,16$). Hier schütteten die behandelten Organkulturen zwischen 199,7 ng/ml und 290,7 ng/ml PEDF aus, im Mittelwert 238,4 ng/ml ($\pm 29,4$ ng/ml). Die entsprechenden Kontrollen lagen zwischen 177,1 ng/ml und 260,7 ng/ml mit einem Mittelwert von 207,0 ng/ml ($\pm 22,1$ ng/ml). Das OKM enthielt 147 ng/ml. So führte die SRT-Behandlung bei beiden Spotgrößen zu einer signifikanten Erhöhung der PEDF-Sekretion in das apikale Kompartiment (siehe Abb. 13a).

4.2.2.2 Behandlung mittels Thermischer Stimulation der Retina

Die Ergebnisse für die 100 μ m Spotgröße wurden bereits in Richert et al. 2020 (Richert et al. 2020b) veröffentlicht. Eine Behandlung mit der TSR führte bei den 100 μ m Spots zu einer Induktion von PEDF im apikalen Kompartiment an Tag drei. Diese war im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle diskret, jedoch signifikant auf das 1,08-fache ($p < 0.05$, $\pm 0,10$) erhöht. Die behandelten Organkulturen schütteten zwischen 89,0 ng/ml und 120,5 ng/ml PEDF aus mit einem Mittelwert von 107,3 ng/ml ($\pm 10,4$ ng/ml). Die entsprechenden Kontrollen lagen zwischen 83,9 ng/ml und 110,8 ng/ml PEDF, im Mittelwert 99,3 ng/ml ($\pm 8,4$ ng/ml). Jedoch enthielt OKM auch 105,1 ng/ml PEDF. Bei den 200 μ m großen Spots kam es an Tag drei zu keiner signifikanten Veränderung der PEDF-Ausschüttung nach apikal (1,07-fache der Kontrolle, $\pm 0,16$) in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle. So zeigt sich eine diskrete

Zunahme der PEDF-Sekretion, die sich jedoch nur für die 100 µm Spots als statistisch signifikant erwies (siehe Abb. 13b). Bei den 200 µm Spots schütteten die Organkulturen zwischen 204,9 ng/ml und 283,3 ng/ml PEDF aus, im Mittelwert 243,2 pg/ml (\pm 25,5 pg/ml). Die entsprechenden Kontrollen lagen zwischen 183,1 ng/ml und 251,1 ng/ml PEDF mit einem Mittelwert von 229,3 ng/ml (\pm 20,3 pg/ml). Das OKM enthielt 147 ng/ml.

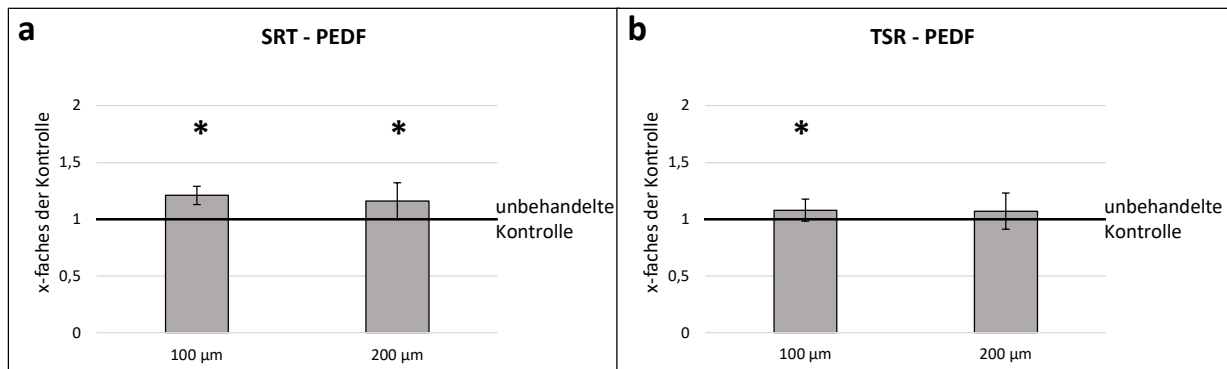


Abbildung 13: Ausschüttung des *Pigment Epithelium-Derived Factor* (PEDF) in den apikalen Überständen an Tag drei nach Behandlung der Organkulturen mit Selektiver Retinatherapie (SRT) und Thermischer Stimulation der Retina (TSR). (a) stellt die Ergebnisse für die apikale PEDF-Ausschüttung nach Selektiver Retinatherapie dar (Papenkort et al. 2021). Sowohl für 100 µm (n = 10) als auch für die 200 µm (n = 11) Spotgröße fand sich eine signifikante (durch * gekennzeichnet, $p < 0.05$) Erhöhung der PEDF-Ausschüttung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (schwarze Linie). In (b) finden sich die Ergebnisse für die apikale PEDF-Ausschüttung nach Thermischer Stimulation der Retina nach Richert et al. (Richert et al. 2020b) und Papenkort et al. (Papenkort et al. 2021). Hierbei fand sich eine geringe Erhöhung, die nur für die 100 µm (n = 10) Spots signifikant war. (TSR 200 µm n = 9).

4.2.3 Ausschüttung des *Brain-Derived Neurotropic Factor* (BDNF)

BDNF wurde mithilfe eines kommerziell erworbenen ELISA-Tests (siehe auch 3.1.5 und 3.5) in den Organkulturüberständen von Tag drei untersucht. Es wurden unbehandelte Kontrollen und mit 200 µm Spots der SRT behandelte Organkulturen ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass in dem verwendeten Modell der Organkulturen von den unbehandelten RPE-Zellen kein BDNF nach apikal ausgeschüttet wurde. Dies wurde auch nicht durch die SRT-Behandlung des Gewebes (200 µm Spots) induziert. Somit lässt sich festhalten, dass RPE-Zellen im Organkulturmodell der modifizierten Ussingkammer unter den oben erläuterten Bedingungen der Kultivierung kein BDNF nach apikal exprimieren. Daher wurden die 100 µm Spots und die TSR-Behandlung hinsichtlich einer BDNF-Ausschüttung nach apikal nicht mehr ausgetestet.

4.2.4 Ausschüttung des *Nerve Growth Factor* (NGF)

NGF wurde mithilfe eines kommerziell erworbenen ELISA-Tests (siehe auch 3.1.5 und 3.5) in den apikalen Organkulturüberständen von Tag drei untersucht. Es wurden unbehandelte Kontrollen und mit 200 µm großen Spots behandelte Organkulturen sowohl der SRT als auch der TSR ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass in dem verwendeten Modell der Organkulturen von den unbehandelten RPE-Zellen kein NGF nach apikal ausgeschüttet wurde. Dies wurde auch nicht durch die Laserbehandlungen (SRT und TSR) des Gewebes induziert. Da die RPE-Zellen im verwendeten Organkulturmodell in der modifizierten Ussingkammer unter den oben erläuterten Bedingungen der Kultivierung kein NGF nach apikal exprimiert haben, wurde auf eine weitere Austestung der kleineren 100 µm Spots verzichtet.

4.2.5 Ausschüttung des *Transforming Growth Factor beta* (TGF-β)

TGF-β weist ebenfalls neuroprotektive Eigenschaften auf (siehe auch 1.1.3) und wurde darüber hinaus unter dem Aspekt der EMT untersucht. Diese ist ein Hinweis auf Narbenbildung, welche eine ungewollte Komplikation der Laserbehandlung wäre. Der Nachweis erfolgte mithilfe eines kommerziell erworbenen ELISA-Kits (siehe auch 3.1.5 und 3.5) aus den Organkulturüberständen an Tag drei. Die Werte werden als x-faches der unbehandelten Kontrolle (± STABW) angegeben und sind in Abb. 14 dargestellt.

4.2.5.1 Behandlung mittels Selektiver Retinatherapie

Nach Behandlung mit der SRT zeigte sich sowohl bei den kleineren 100 µm Spots (1,05-fache der Kontrolle, ± 0,09) als auch bei den größeren 200 µm Spots (1,02-fache der Kontrolle, ± 0,08) keine signifikante Veränderung der apikalen TGF-β-Ausschüttung (siehe Abb. 14a). Die Organkulturen, welche mit 100 µm Spots behandelt wurden, schütteten zwischen 838,5 pg/ml und 1147,7 pg/ml TGF-β aus, im Mittelwert 920,6 pg/ml (± 83,9 pg/ml). Die entsprechenden Kontrollen lagen zwischen 808,7 pg/ml und 959,0 pg/ml TGF-β mit einem Mittelwert von 876,7 pg/ml (± 47,9 pg/ml). Das verwendete OKM enthielt 897,5 pg/ml TGF-β. Bei den 200 µm Spots schütteten die Organkulturen zwischen 873,1 pg/ml und 1110,2 pg/ml TGF-β aus, im Mittelwert 932,5 pg/ml (± 72,6 pg/ml). Die entsprechenden Kontrollen lagen

zwischen 817,4 pg/ml und 1115,7 pg/ml TGF- β mit einem Mittelwert von 919,6 pg/ml (\pm 87,4 pg/ml). Hierbei enthielt das verwendete reine OKM 1214,6 pg/ml TGF- β .

4.2.5.2 Behandlung mittels Thermischer Stimulation der Retina

Die Ergebnisse für die 100 μ m Spotgröße wurden bereits in Richert et al. 2020 (Richert et al. 2020b) veröffentlicht. Die TSR-Behandlung führte für die 100 μ m Spots (1,01-fache der Kontrolle, \pm 0,13) und die 200 μ m Spots (1,03-fache der Kontrolle, \pm 0,07) nicht zu einer signifikanten Veränderung der Sekretion von TGF- β nach apikal. Daher führte die Behandlung mit dem TSR-Modus zu keiner Änderung der TGF- β -Ausschüttung in das apikale Kompartiment (siehe Abb. 14b). Die Organkulturen, welche mit 100 μ m Spots behandelt wurden, schütteten zwischen 679,9 pg/ml und 908,4 pg/ml TGF- β aus, im Mittelwert 828,9 pg/ml (\pm 68,8 pg/ml). Die entsprechenden Kontrollen lagen zwischen 678,9 pg/ml und 1032,7 pg/ml TGF- β mit einem Mittelwert von 833,5 pg/ml (\pm 105,7 pg/ml). Das verwendete OKM enthielt 897,5 pg/ml TGF- β . Bei den 200 μ m Spots schütteten die Organkulturen zwischen 876,8 pg/ml und 1075,6 pg/ml TGF- β aus, im Mittelwert 948,8 pg/ml (\pm 69,4 pg/ml). Die entsprechenden Kontrollen lagen zwischen 856,8 pg/ml und 963,0 pg/ml TGF- β mit einem Mittelwert von 917,5 pg/ml (\pm 42,9 pg/ml). Hierbei enthielt das verwendete OKM 1214,6 pg/ml TGF- β .

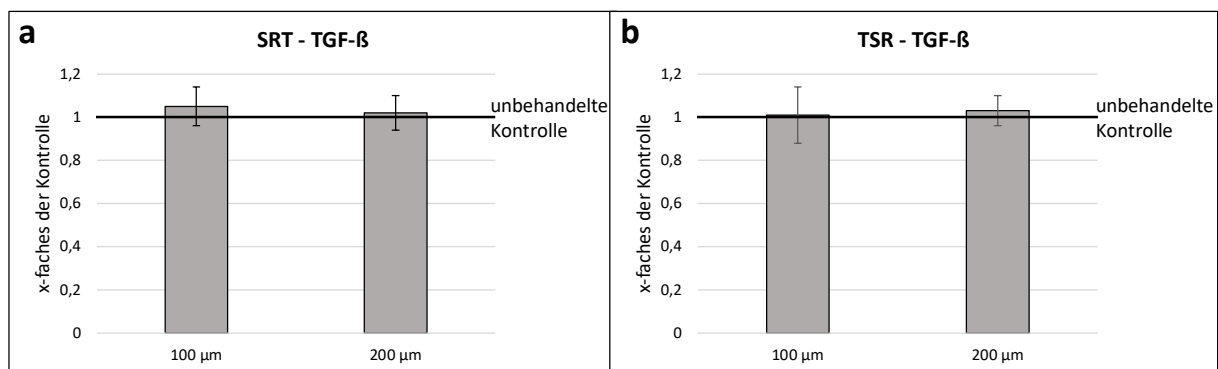


Abbildung 14: Ausschüttung des *Transforming Growth Factor beta* (TGF- β) in den apikalen Überständen an Tag drei nach Behandlung der Organkulturen mit Selektiver Retinatherapie und Thermischer Stimulation der Retina. (a) zeigt die TGF- β Ergebnisse nach Selektiver Retinatherapie (n = 10). In (b) sind die TGF- β Ergebnisse nach Thermischer Stimulation der Retina (n = 9) dargestellt (nach Richert et al. (Richert et al. 2020b) *data not shown*). Beide Laserverfahren hatten keinen signifikanten Effekt auf die apikale Ausschüttung des TGF- β im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (schwarze Linie).

4.3 Ergebnisse des SH-SY5Y-Zellmodells

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse aus den Experimenten mit dem SH-SY5Y-Zellmodell vorgestellt. Dieses wurde genutzt, um ein möglicherweise durch die Laserbehandlungen induziertes neuroprotektives Zellmilieu indirekt nachzuweisen. Um einen protektiven Effekt darzustellen, wurde oxidativer Stress in Form von H₂O₂, TBHP und Erastin auf die Zellen angewandt. Die gewonnenen Daten wurden bereits in Papenkort et al. (Papenkort et al. 2021) veröffentlicht.

4.3.1 Vorversuche zur Kultivierung der SH-SY5Y-Zellen auf der 96-Well-Platte

In den Austestungen zu dem Wachstumsverhalten der SH-SY5Y-Zellen auf der 96-Well-Platte stellten sich folgende Bedingungen für die Kultivierung als am besten geeignet heraus: Die Zellen entwickelten einen konfluenten Zellrasen und zeigten die Differenzierungsmerkmale von Clusterbildung, einer dreieckigen Zellform und der Ausbildung langer Zellfortsätze am besten, wenn zu Beginn 10.000 Zellen/Well ausgesät wurden. Weiterhin benötigten die SH-SY5Y-Zellen 5 % FCS im Medium, da bei geringeren Konzentrationen (0 % oder 1 %) nach optischer Beurteilung unter dem Auflichtmikroskop eine Differenzierung ausblieb und sich kein konfluenter Zellrasen entwickeln konnte. Ohne FCS blieben die Zellen rund und somit pyknisch. Eine Kultivierung mit 10 % FCS im Medium führte in der optischen Beurteilung ebenfalls zu einem weniger geeigneten Zellrasen und wird unter 4.3.3 im Hinblick auf die Auswirkungen auf die Stressresistenz der Zellen vorgestellt.

4.3.2 Stresstitration für die SH-SY5Y-Zellen

4.3.2.1 Stresstitration bei Verwendung von Grundmedium

Im geplanten neuronalen Zellmodell der SH-SY5Y-Zellen sollten die Zellen oxidativem Stress ausgesetzt werden. Als Ziel wurde eine Reduktion der Zellaktivität im MTT-Assay um 50 % definiert. Diese Reduktion reicht aus, um einen möglichen protektiven Effekt der Organkulturüberstände aufzuzeigen, jedoch ist ein ausreichendes Überleben der Zellen gewährleistet, um einen protektiven Effekt der Überstände nachweisen zu können. Wie bereits im Methodenteil beschrieben, wurden zunächst

Versuche mit TBHP, H_2O_2 und Erastin als Stressoren durchgeführt. Diese wurden in GM ohne FCS auf die Zellen gegeben und nach 24 h mithilfe eines MTT-Assays ausgewertet. Als Kontrolle wurde ein MTT-Assay von Zellen ohne Zugabe eines Stressors angefertigt. Dieser Wert wurde gleich 100 % gesetzt, um die Reduktion durch den Stressor angeben zu können. Die Ergebnisse dieser Titration sind in Abb. 15 graphisch dargestellt und in Tab. 13 im Anhang mit Standardabweichungen und Signifikanzen aufgeführt.

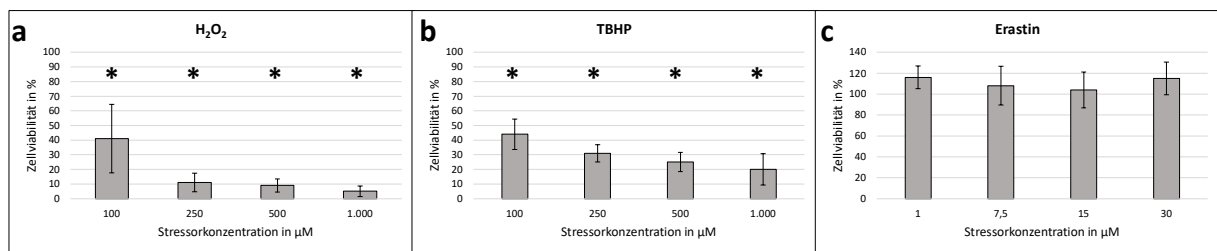


Abbildung 15: Stresstitration auf der Basis von Grundmedium (GM). Ausgetestet wurden die Stressoren Wasserstoffperoxid (H_2O_2), dargestellt in (a), tert-Butylhydroperoxid (TBHP), dargestellt in (b) und Erastin, dargestellt in (c). Bei H_2O_2 und TBHP finden sich niedrigere Werte als bei der unbehandelten Kontrolle (100 %). Je höher die entsprechende Konzentration, desto niedriger die Aktivität der SH-SY5Y-Zellen im Methyl-thiazolyl-tetrazolium (MTT)-Assay. Die Werte waren für $p < 0.05$ signifikant und sind daher durch ein * gekennzeichnet. Bei der Behandlung mit Erastin kam es zu einer leichten Erhöhung der Zellaktivität im MTT-Assay, jedoch ohne Signifikanz (siehe auch Tab. 13 im Anhang).

Es zeigt sich für H_2O_2 und TBHP ein deutlicher Rückgang der Zellviabilität unter 50 % im Vergleich zu ungestressten Kontrolle (100 %). Je höher die Stressorkonzentration, desto geringer war die Zellviabilität. Alle gemessenen Werte waren für ein Signifikanzniveau von $p < 0.05$ signifikant (siehe auch Tab. 13 im Anhang). Erastin führte zu einer leichten Erhöhung der Zellviabilität im MTT-Assay, welche sich jedoch nicht als signifikant erwies. Unter diesen Messungen hat sich die Konzentration von 100 µM TBHP am geeignetsten erwiesen, da sie der angestrebten 50 %-igen Reduktion am nächsten kam.

4.3.2.2 Stresstitration bei Verwendung von Organkulturmedium

Für die bessere Adaptation an die geplanten Versuche wurden erneute Austestungen der oxidativen Stressoren auf der Basis von OKM durchgeführt. Dieses Medium ist die Grundlage der Überstände aus den Versuchen mit den Organkultur-Explantaten und erhält ca. 10 % FCS (siehe auch Tab. 5 unter 3.1.4). Somit musste die Stresstitration

an die Bestandteile des Mediums und insbesondere an einen FCS-Gehalt von 10 % angepasst werden, da diese Störgröße nicht ausgeklammert werden konnte. Es wurden nur noch TBHP und H_2O_2 getestet, da Erastin bei der Stresstitration mit GM nicht zu einem Rückgang der Zellaktivität im MTT-Assay geführt hat (siehe auch Abb. 15). Zunächst wurde das alte Medium entfernt und dann OKM ohne Stressor entweder für 1 h oder für 24 h auf die Zellen gegeben. Im Anschluss wurde die entsprechende Konzentration des Stressors hinzugefügt. Als Kontrolle (100 %) wurde die Aktivität von SH-SY5Y-Zellen, die für 1 h oder 24 h mit OKM ohne Stressor inkubiert wurden, herangezogen. Die erzielten Ergebnisse sind in Abb. 16 dargestellt und in Tab. 14 und 15 im Anhang mit Standardabweichungen und Signifikanzen aufgeführt.

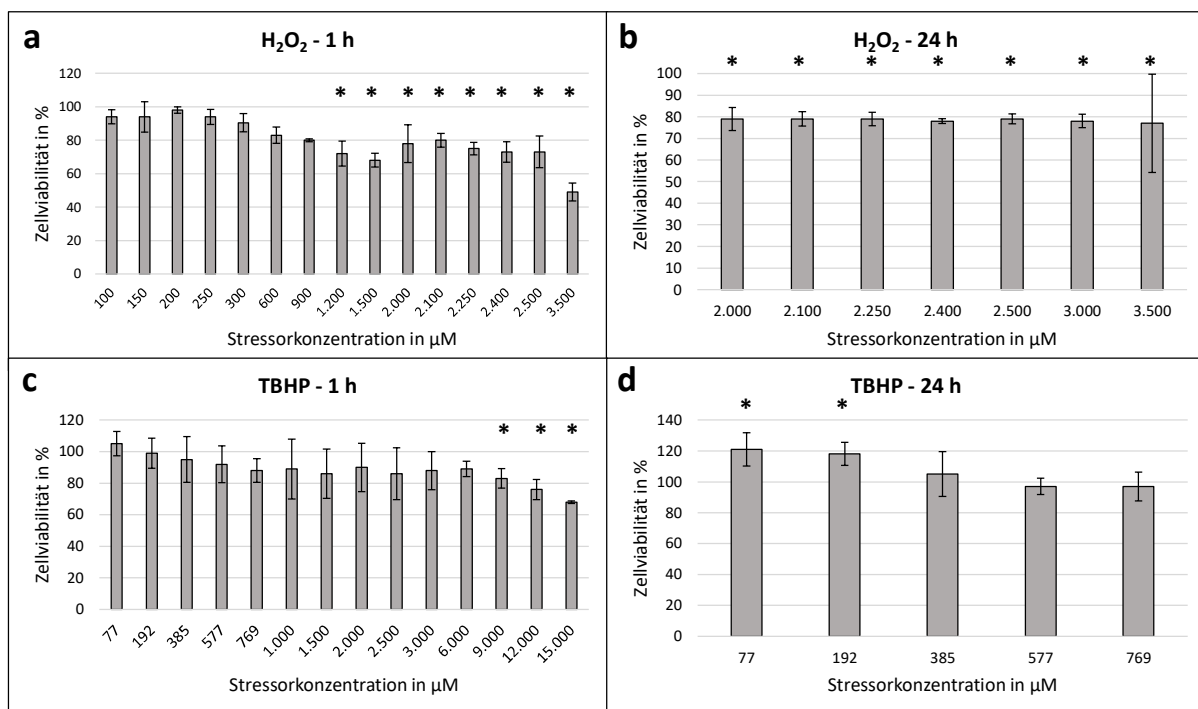


Abbildung 16: Stresstitration auf der Basis von Organkulturmedium (OKM). In (a) finden sich die Ergebnisse für die Titration mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) nach 1 Stunde (h) Vorinkubation mit OKM. Es zeigte sich in Abhängigkeit von der steigenden Konzentration ein Rückgang der Zellviabilität der SH-SY5Y-Zellen im Methyl-thiazolyl-tetrazolium (MTT)-Assay, der sich ab einer Konzentration 1.200 μM als signifikant erwies ($p < 0.05$, durch * gekennzeichnet). In (b) sind die Ergebnisse für hohe Konzentrationen H_2O_2 nach 24 h Vorinkubation mit OKM dargestellt, welche alle signifikant ($p < 0.05$) waren und ebenfalls durch ein * gekennzeichnet sind. Die Daten wurden bereits in Papenkort et al. (Papenkort et al. 2021) veröffentlicht. In (c) und (d) finden sich die Ergebnisse für die Titration mit tert-Butylhydroperoxid (TBHP), ebenfalls unterteilt in 1 h (c) und 24 h (d) Vorinkubation mit OKM. Es zeigte sich mit zunehmender Konzentration eine Abnahme der Zellaktivität im MTT-Assay, jedoch waren die erforderlichen Konzentrationen deutlich höher als bei H_2O_2 . Die entsprechenden Daten sind auch noch einmal in Tab. 14 im Anhang angegeben.

Auf Basis des FCS-haltigen OKM waren deutlich höhere Konzentrationen der Stressoren vonnöten, um einen Rückgang der Aktivität der SH-SY5Y-Zellen im MTT-Assay zu verzeichnen als bei der Stresstitration auf Basis von GM ohne FCS (siehe auch 4.3.2.1). Weiterhin lässt sich feststellen, dass eine vorherige Inkubation mit OKM über 24 h ebenfalls zu einer höheren Zellviabilität führt, als wenn diese Inkubation nur über 1 h erfolgt ist. Der Rückgang der Aktivität der SH-SY5Y-Zellen im MTT-Assay steigt mit zunehmender Stressorkonzentration sowohl bei TBHP als auch bei H_2O_2 , allerdings fallen die Änderungen zwischen den Titrationsschritten geringer aus als bei der Titration mit GM ohne FCS (siehe auch 4.3.2.1). Bei der Titration mit H_2O_2 ist der messbare Effekt des oxidativen Stresses im MTT-Assay größer als bei TBHP und darüber hinaus ab einer Konzentration von 1.200 μM für jede Messung signifikant ($p < 0.05$, siehe auch Tab. 14 im Anhang). Bei TBHP kommt es erst ab einer Konzentration von 6.000 μM zu einem signifikanten Rückgang. Somit hat sich auf OKM-Basis H_2O_2 als besserer Auslöser des oxidativen Stresses erwiesen. Es wurde sich für 3.500 μM H_2O_2 entschieden, da hierbei nach 1 h Vorinkubation ein signifikanter ($p < 0.05$) Rückgang der Zellviabilität im MTT-Assay auf 49 % (STABW 5,41) gemessen wurde.

4.3.3 Einfluss verschiedener Konzentrationen von Fetalem Kälberserum (FCS) in der Kultivierung auf die Stressresistenz der SH-SY5Y-Zellen

Da sich eine höhere Resistenz gegen oxidativen Stress bei Verwendung von OKM mit 10 % FCS (siehe auch 4.3.2.2) im Gegensatz zu GM ohne FCS (siehe auch 4.3.2.1) zeigte, wurde ebenfalls ausgetestet, wie sich die SH-SY5Y-Zellen bei Konfrontation mit oxidativem Stress durch H_2O_2 verhalten, wenn sie nicht mit KM2 (5 % FCS) für 96 h auf den 96-Well-Platten kultiviert wurden, sondern mit einem höheren FCS-Anteil von 10 %. Dafür wurden die Kultivierungsbedingungen der SH-SY5Y-Zellen wie unter 3.6.5 beschrieben konstant gehalten, lediglich das Medium wurde verändert. Die Durchführung der Stresstitration erfolgte in allen Ansätzen wieder in Anlehnung an die späteren Versuche auf OKM-Basis. Die entsprechenden Ergebnisse finden sich in Abb. 17 und im Anhang in den Tab. 14-17.

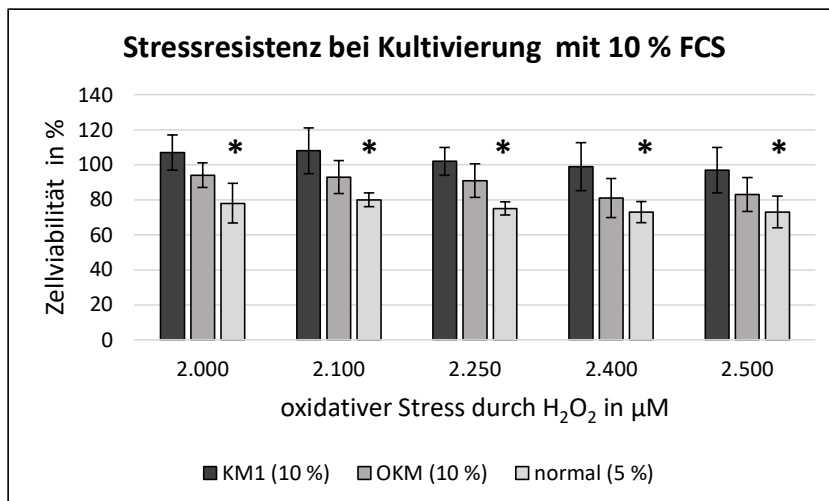


Abbildung 17: Zellviabilität der neuronalen SH-SY5Y-Zellen unter dem Einfluss von oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in Abhängigkeit von verschiedenen Medien in der Kultivierung. Es zeigte sich eine erhöhte Zellviabilität, wenn die Zellen mit 10 % Fetalem Kälberserum (FCS) im Medium (Kulturmedium 1 (KM1) und Organkulturmedium (OKM)) im Gegensatz zu 5 % FCS (normale Bedingungen) kultiviert wurden. Weiterhin fiel auf, dass sich die Viabilität der Zellen bei einem höheren FCS-Gehalt oberhalb oder deutlich näher an der Kontrolle ohne oxidativen Stress durch H₂O₂ (100 %) befand als es bei einer Kultivierung mit 5 % FCS der Fall war. Der Rückgang der Zellviabilität bei Verwendung des normalen Mediums mit 5 % FCS war für alle Konzentrationen signifikant, bei Verwendung der Medien mit 10 % FCS waren die erzielten Ergebnisse jedoch nicht signifikant. Die Ergebnisse finden sich auch im Anhang in den Tab. 14-17.

Es konnte gezeigt werden, dass die neuronale Zelllinie bei 10 % FCS im Medium noch eine höhere Aktivität im MTT-Assay zeigt als bei 5 % FCS unter ansonsten identischen Bedingungen. Somit zeigt sich wie auch schon beim Vergleich von GM und OKM ein Effekt durch die höhere FCS-Konzentration. Jedoch bleibt festzuhalten, dass die Zellen in der morphologischen Beurteilung unter dem Auflichtmikroskop im Vergleich zu der Standardkultivierung mit KM2 deutlich schlechter aussahen. So waren gleichmäßiges Wachstum und Zellvernetzung nur in einem reduzierten Ausmaß vorhanden. Es häuften sich weiterhin die Ausbildung von Zellkonglomeraten, die sich vom Boden des Wells abhoben. Dies führte dazu, dass die Kultivierung der SH-SY5Y-Zellen auf der 96-Well-Platte weiterhin mit KM2 und 5 % FCS durchgeführt wurde. Aufgrund der beschriebenen Austestungen mit OKM unter 4.3.2.1 wurde 3.500 µM als geeigneter Auslöser von oxidativem Stress für die SH-SY5Y-Zellen festgelegt. So konnten die Experimente mit den generierten Überständen aus dem Versuchsteil der mit den Laserverfahren behandelten Organkulturen durchgeführt werden.

4.3.4 Austestung der Stressresistenz der Zellen mit den Organkulturüberständen

4.3.4.1 Ergebnisse der Überstände von Tag eins

Mit der in der Stresstitration ermittelten Konzentration von 3.500 μM H_2O_2 konnte die Austestung mit den Überständen aus den Organkulturversuchen durchgeführt werden. So wurden die SH-SY5Y-Zellen wie beschrieben auf 96-Well-Platten kultiviert und 96 h nach optischer Beurteilung unter dem Auflichtmikroskop in die Versuche eingeschlossen. Für jeden untersuchten Lasermodus wurden sechs Wiederholungen durchgeführt. Des Weiteren wurden sowohl Plattenkontrollen mit frischem OKM als auch Stressorkontrollen mit OKM und 3.500 μM H_2O_2 aufgetragen. Im folgenden Abschnitt finden sich die Ergebnisse der MTT-Assays.

Für alle im nachfolgenden Abschnitt beschriebenen Experimente lässt sich festhalten, dass das Stressen der SH-SY5Y-Zellen mit der errechneten Konzentration von 3.500 μM H_2O_2 erfolgreich war. So zeigte sich bei 1 h eine signifikante Reduktion der Zellaktivität auf 49 % ($\pm 5,41$; $p < 0.05$), bei 24 h hingegen eine etwas geringere, jedoch ebenfalls signifikante Reduktion auf 77 % ($\pm 22,74$; $p < 0.05$) im Vergleich zu der Plattenkontrolle. Des Weiteren zeigte sich, dass die Zellen, die mit Organkulturüberständen und oxidativem Stress inkubiert wurden, eine geringere Zellaktivität aufwiesen als die Stressorkontrolle, welche wie auch in der Stresstitration auf der Basis von frischem, unverbrauchtem OKM durchgeführt wurde.

Für die Interpretation der Ergebnisse wurde die Probe, welche weder gelasert noch mit oxidativem Stress behandelt wurde, gleich 100 % gesetzt und die anderen Proben dazu ins Verhältnis gesetzt. Ohne oxidativen Stressor wies keiner der untersuchten Lasermodi (SRT 100 μm / SRT 200 μm / TSR 100 μm / TSR 200 μm) eine signifikant höhere Zellaktivität im Vergleich zu den nicht mit dem Laser behandelten Überständen aus den Organkultur-Experimenten auf. Dies zeigte sich sowohl nach 1 h Einwirkzeit des Überstandes als auch nach 24 h Kultivierung mit den Überständen vor der Stressexposition.

Bei Konfrontation mit der Stresskonzentration von 3.500 μM H_2O_2 zeigte sich nach 1 h Einwirkzeit der Überstände keine signifikant höhere Aktivität der Zellen, die mit einem Überstand der gelaserten Organkulturen behandelt wurden. Die Ergebnisse sind in Abb. 18 sowie Tab. 18 im Anhang dargestellt.

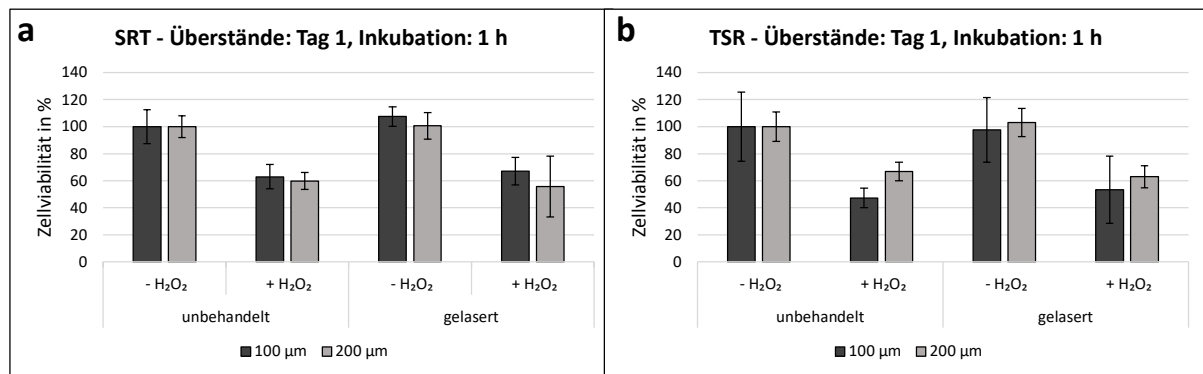


Abbildung 18: Zellviabilität der SH-SY5Y-Zellen nach Zugabe der apikalen Organkulturüberstände von Tag eins, Inkubation für eine Stunde und Zugabe von oxidativem Stress. In (a) sind die Ergebnisse der Überstände (n = 6) nach Selektiver Retinatherapie (SRT) dargestellt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den unbehandelten und den gelaserten Proben. Dies änderte sich auch nicht durch Zugabe von oxidativem Stress in Form von 3.500 μM Wasserstoffperoxid (H_2O_2). In (b) finden sich die Ergebnisse der Überstände (n = 6) nach Thermischer Stimulation der Retina (TSR). Hierbei fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den unbehandelten und den gelaserten Proben unabhängig von der Zugabe von oxidativem Stress durch 3500 μM H_2O_2 (siehe auch Tab. 16 im Anhang).

Jedoch fand sich nach einer 24-stündigen Inkubation der SH-SY5Y-Zellen mit den Organkulturüberständen nach der Konfrontation mit H_2O_2 eine signifikant höhere Zellaktivität der Überstände der mit TSR 200 μm gelaserten Organkulturen im Vergleich zu den ebenfalls mit oxidativem Stress konfrontierten Zellen, die mit den Überständen der nicht gelaserten Organkulturen inkubiert wurden. Die Zellviabilität des neuronalen Zellmodells lag nach Zugabe der mit 200 μm TSR gelaserten Organkulturüberständen mit 156 % signifikant ($p < 0.05$) höher (Papenkort et al. 2021). Für die anderen drei untersuchten Lasermodi (SRT 100 μm / SRT 200 μm / TSR 100 μm) zeigte sich diesbezüglich kein signifikanter Aktivitätsanstieg. Das Diagramm in Abb. 19 zeigt die Ergebnisse der MTT-Assays in einer graphischen Aufarbeitung. Außerdem finden sich die Daten in Tab. 19 im Anhang aufgelistet.

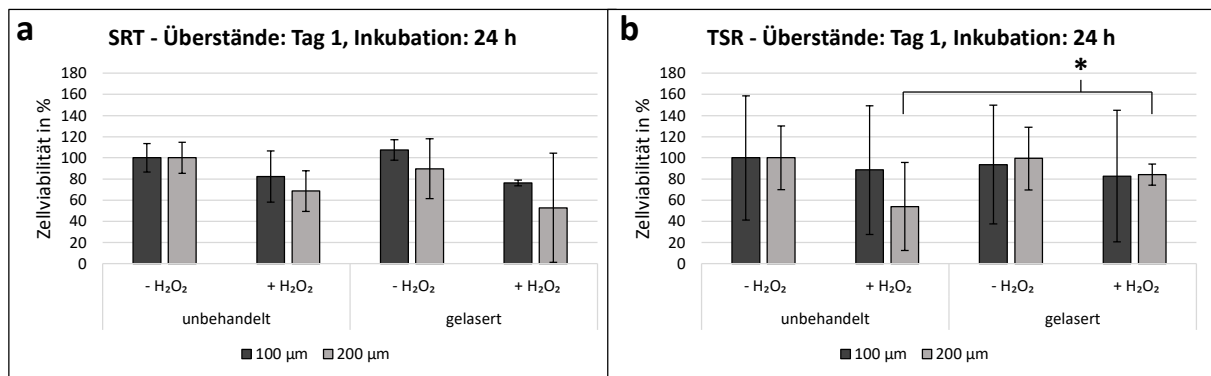


Abbildung 19: Zellviabilität der SH-SY5Y-Zellen nach Zugabe der apikalen Organkulturüberstände von Tag eins, Inkubation für 24 Stunden und Zugabe von oxidativem Stress. Die Daten dieser Abbildung wurden bereits in Papenkort et al (Papenkort et al. 2021) publiziert. In (a) sind die Ergebnisse der Überstände (n = 6) nach Selektiver Retinatherapie (SRT) dargestellt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den unbehandelten und den gelaserten Proben. Dies änderte sich auch nicht durch Zugabe von oxidativem Stress. In (b) finden sich die Ergebnisse der Überstände (n = 6) nach Thermischer Stimulation der Retina (TSR). Hierbei fand sich ohne oxidativen Stress kein signifikanter Unterschied zwischen den unbehandelten und den gelaserten Proben. Bei Zugabe von oxidativem Stress durch 3.500 µM H₂O₂ zeigte sich jedoch eine signifikant (durch * gekennzeichnet, p<0.05) höhere Zellaktivität im Methyl-thiazolyl-tetrazolium (MTT)-Assay bei den Überständen nach Laserbehandlung im Vergleich zu den unbehandelten Proben (siehe auch Tab. 17 im Anhang).

4.3.4.2 Ergebnisse der Überstände von Tag drei

Ebenso wie die Überstände von Tag eins wurden auch die Überstände von Tag drei im neuronalen Zellmodell der SY-SY5Y-Zellen ausgetestet. Hierfür wurde auf eine ältere Passage der Zellen zurückgegriffen, sodass die Konzentration von H₂O₂ auf 3.000 µM angepasst wurde, um eine vergleichbare Reduktion durch den oxidativen Stress zu erzeugen. Alle weiteren Parameter blieben unverändert. Da die Organkulturüberstände von Tag drei bereits in den ELISA-Tests auf verschiedene Zellmediatoren ausgetestet wurden, konnte aus Kapazitätsgründen nur eine der beiden Einwirkzeiten (1 h vs. 24 h) untersucht werden. In Abhängigkeit von den Ergebnissen von Tag eins wurde sich für 24 h entschieden, da dort ein signifikanter Effekt der Laserbehandlung (TSR 200 µm) verzeichnet werden konnte.

In der Untersuchung der Überstände von Tag drei konnten sich die Ergebnisse der Austestung der Überstände von Tag eins bestätigen. So zeigte sich ebenfalls eine signifikante und ausreichende Reduktion der Zellaktivität im MTT-Assay durch die ausgewählten 3.000 µM H₂O₂ auf 78 % (± 3,10; p<0.05) nach 24 h Vorinkubation mit OKM im Vergleich zu der Plattenkontrolle. Genau wie bereits nach Untersuchung der

Organkulturüberstände von Tag eins im neuronalen Zellmodell festgestellt, lag auch bei den Überständen von Tag drei kein signifikanter Unterschied der Zellaktivität der SH-SY5Y-Zellen zwischen den gelaserten und den nicht gelaserten Organkulturüberständen vor, wenn die Zellen keinem oxidativen Stress ausgesetzt wurden. Für TSR 200 µm konnte eine signifikant erhöhte Zellaktivität auf 155 % ($p < 0.05$) (Papenkort et al. 2021) nach Behandlung mit dem gelaserten Organkulturüberständen und anschließendem oxidativem Stress im Vergleich zu mit oxidativem Stress konfrontierten Zellen, welche mit Überständen der nicht gelaserten Organkultur behandelt wurden, detektiert werden. Die anderen untersuchten Lasermodi (SRT 100 µm / SRT 200 µm / TSR 100 µm) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den gelaserten Überständen und den nicht gelaserten Überständen (siehe auch Tab. 18). Das Diagramm in Abb. 20 zeigt die Ergebnisse der MTT-Assays aus Tab. 20 im Anhang in einer graphischen Aufarbeitung.

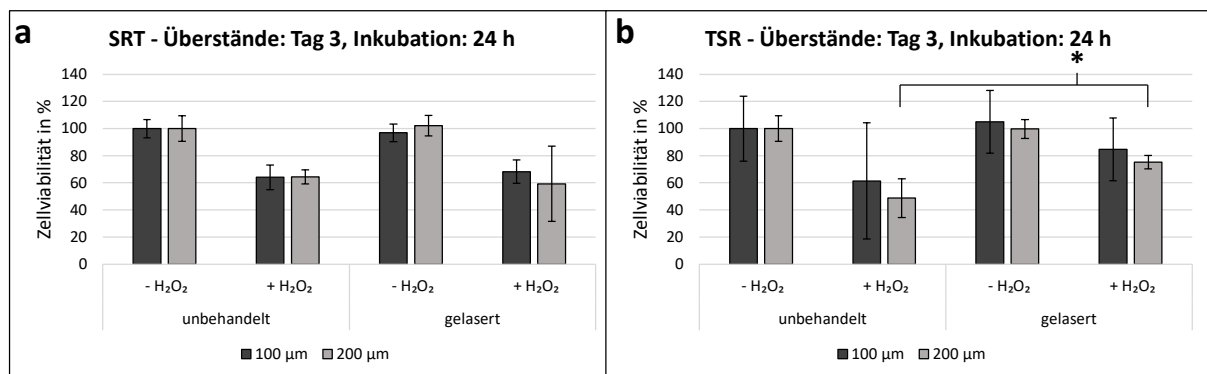


Abbildung 20: Zellviabilität der SH-SY5Y-Zellen nach Zugabe der apikalen Organkulturüberstände von Tag drei, Inkubation für 24 Stunden und Zugabe von oxidativem Stress. Die Daten dieser Abbildung wurden bereits in Papenkort et al (Papenkort et al. 2021) publiziert. In (a) sind die Ergebnisse der Überstände ($n = 6$) nach Selektiver Retinatherapie (SRT) dargestellt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den unbehandelten und den gelaserten Proben. Dies änderte sich auch nicht durch Zugabe von oxidativem Stress. In (b) finden sich die Ergebnisse der Überstände ($n = 6$) nach Thermischer Stimulation der Retina (TSR). Hierbei fand sich ohne oxidativen Stress kein signifikanter Unterschied zwischen den unbehandelten und den gelaserten Proben. Bei Zugabe von oxidativem Stress durch 3.000 µM Wasserstoffperoxid (H₂O₂) zeigte sich jedoch eine signifikant (durch * gekennzeichnet, $p < 0.05$) höhere Zellaktivität im Methyl-thiazolyl-tetrazolium (MTT)-Assay bei den Überständen nach Laserbehandlung im Vergleich zu den unbehandelten Proben (siehe auch Tab. 18 im Anhang).

Somit lässt sich festhalten, dass eine TSR-Behandlung mit 200 µm großen Spots in dem oben beschriebenen Aufbau zu einem signifikant höheren Überleben der neuronalen Zellen bei Vorliegen von oxidativem Stress führt. Die kleineren 100 µm

Spots konnten keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Stressresistenz auslösen. Ebenso konnte die SRT-Behandlung der Organkulturen keinen signifikanten Effekt im verwendeten neuronalen Zellmodell hervorbringen.

5 DISKUSSION

Die Laserverfahren SRT und TSR wurden in dieser Arbeit unter dem besonderen Fokus der Neuroprotektion als mögliche therapeutische Option für die AMD untersucht. Die AMD ist in Industrienationen die häufigste Erblindungsursache bei über 65-jährigen (Schrader 2006) und eine multifaktorielle Erkrankung. Es wurde ein Organkulturmodell des Komplexes aus RPE, BrM und Choroidea verwendet, da die AMD-Pathogenese hauptsächlich dort stattfindet. Als Modell-Organismus wurde das Schwein verwendet.

5.1 Vorteile und Limitationen des verwendeten Modells

Für die Darstellung der Auswirkungen der Laserverfahren SRT und TSR auf die apikale Zellmediatorausschüttung und die Untersuchung einer möglichen neuroprotektiven Wirkung wurde ein porcines Organkulturmodell verwendet. Die Schweineaugen wurden ausgewählt, da sie in ihrem anatomischen Aufbau dem menschlichen Auge sehr ähnlich sind. So haben sie die gleiche Größe und einen ähnlichen anatomischen Aufbau wie ein menschliches Auge (Schnichels et al. 2021). Außerdem weist die Retina bei beiden eine ähnliche Dicke auf, ist in ihrer Schichtung identisch (Schnichels et al. 2021) und hat eine ähnlich hohe Zapfendichte (Middleton 2010). Somit sind beide an Sehen bei Tag adaptiert (Schnichels et al. 2021). Schweineaugen weisen zwar im Gegensatz zu Menschen keine Makula mit *Fovea centralis* als Ort des schärfsten Sehens auf, haben allerdings mit der *Area centralis* eine ähnliche Region innerhalb der Retina, die eine deutlich höhere Zapfendichte aufweist als periphere Areale (Schnichels et al. 2021).

Zusätzlich ist die Gefäßversorgung der Retina durch ein retinales und choroideales Gefäßsystem ähnlich aufgebaut (Schnichels et al. 2021), jedoch werden die retinalen Gefäße im porcinen Auge anders als beim Menschen nicht durch eine Zentralarterie gespeist (Middleton 2010). Das RPE im porcinen Auge ist wie beim Menschen durchgehend pigmentiert, was das Modell verbessert und eine Voraussetzung für die adäquaten Behandlungen mit den Laserverfahren SRT und TSR darstellt. Die Verwendung von porcinen Augen dient durch die gute Verfügbarkeit als Abfallprodukt der Lebensmittelindustrie auch der Reduktion von Tierversuchen und ist daher unter ethischen Betrachtungsaspekten von Vorteil, da man zahlreiche Versuche

durchführen kann, ohne auf separate Versuchstiere zurückgreifen zu müssen. Jedoch sollte als Limitation berücksichtigt werden, dass die porcinen Augen in der Regel von jungen Tieren stammen, die AMD jedoch eine Erkrankung des Alters ist. Es wäre also denkbar, dass sich RPE-Zellen in Abhängigkeit vom Alter bei Laserexposition unterschiedlich verhalten.

Die Nutzung eines Organkulturmodells ist im Vergleich zu einem Zellkulturmodell näher am natürlichen Zustand, weil sich die Zellen im Organkulturmodell in ihrem primären dreidimensionalen Gewebeverband befinden und somit die Beurteilung der Zell-Zell-Interaktion mit auto- oder parakriner Signalübertragung besser gegeben ist (Schnichels et al. 2021). Dazu wurde der Gewebekomplex aus RPE, BrM und Choroidea verwendet. Das Vorhandensein der choroidealen Gefäße ist in diesem Modell von Vorteil, da der Komplex aus RPE, BrM und Choroidea eine zentrale Rolle in der AMD-Pathogenese spielt. Jedoch fehlt die Neuroretina in der Organkultur, da diese in der Präparation komplett entfernt wurde. Dies war erforderlich, da eine Kultivierung des Gewebekomplexes inklusive Neuroretina in der modifizierten Ussingkammer in Vorarbeiten (Treumer et al. 2012; Richert et al. 2018) nicht möglich war. In diesen hatte sich gezeigt, dass die Neuroretina in der verwendeten Kultur sehr schnell degeneriert, was einen erheblichen Störfaktor für die Ergebnisse dargestellt hätte. Dieser Einflussfaktor, der die Ergebnisse durch zahlreiche ausgeschüttete Zellmediatoren der degenerierenden Neurone verfälscht hätte, konnte nur durch die direkte Entfernung der Neuroretina in der Präparation der Organkulturen eliminiert werden. Im Unterschied zu z.B. Mausstämmen handelt es sich bei den Schweinen um genetisch heterogene Tiere, die unter unterschiedlichen Umweltbedingungen aufwachsen. Daher wurde immer eine entsprechende Kontrolle für die Organkulturen aus demselben Auge präpariert aus dem auch die behandelte Organkultur stammte, um möglichst identische Bedingungen zu erzielen. Somit sind aus einem porcinen Auge mindestens zwei Geweberinge entstanden. Daher haben die gelaserte Organkultur und die dazugehörige Kontrolle den identischen genetischen Hintergrund. Auch stellt dies eine ähnliche Pigmentierung des RPE sicher, was eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse ermöglicht. Jedoch kann wegen der Gewährleistung dieses Vorteils nicht nur die der Makula ähnliche *Area centralis* der porcinen Augen verwendet werden, sodass auch peripher gelegene Areale in die Experimente eingeschlossen wurden. Da die AMD sich vornehmlich in der Region der Makula abspielt, gilt es dies zu berücksichtigen, da die Übertragung möglicher Ergebnisse auf

die AMD-Pathogenese eingeschränkt wird. Die Gewebeexplantate wurden nach der Laserbehandlung (siehe auch 5.2) in modifizierten Ussingkammern kultiviert. In diesen ist es möglich zwischen der basalen und apikalen Seite zu differenzieren, welches die *in vivo* Bedingungen möglichst realistisch einfängt. Die Kultivierungsbedingungen wurden über drei Tage aufrechterhalten, da sich in Vorarbeiten (Treumer et al. 2012; Richert et al. 2018) gezeigt hat, dass eine Langzeitkultivierung über Wochen unter den gegebenen Bedingungen nicht möglich ist. Somit sind die erzielten Ergebnisse auf eine kurze Zeitspanne nach der applizierten Behandlung begrenzt und nicht auf eine Langzeitprognose übertragbar. Da es sich bei der modifizierten Ussingkammer um ein statisches System handelt, war ein regelmäßiger Mediumwechsel alle 24 h erforderlich. Dieser erfolgte so, dass potentielle Scherkräfte auf das Gewebe möglichst minimiert wurden (siehe auch 3.2.2). Trotzdem ist eine mechanische Belastung der Organkulturen nicht auszuschließen. Weiterhin ist die eher geringe Menge des Mediums von 1,1 ml über die 24 h konstant, anders als *in vivo*, wo über die besonders gut durchblutete Choroidea ein permanenter Austausch und Abtransport von beispielsweise Schadstoffen gewährleistet ist (Nickla u. Wallman 2010). Nach der Kultivierung der Organkulturen erfolgte eine Calceinfärbung (siehe auch 3.2.3), um eine Beurteilung des Gewebes vorzunehmen. Es konnte damit sichergestellt werden, dass keine durch Risse geschädigten oder abgestorbenen Organkulturen in die Auswertung eingeschlossen wurden und das Gewebe unter den Kultivierungsbedingungen vital blieb.

5.2 Behandlungen der Organkulturen mit den beiden Laserverfahren

Laserverfahren haben in der Ophthalmologie eine lange Tradition und einen hohen Stellenwert. Sie konnten bereits bei zahlreichen Netzhauterkrankungen, wie beispielsweise bei einer Netzhautablösung, erfolgreich eingesetzt werden (Lang u. Lang 2019). Dabei beruht das Behandlungsprinzip auf einer hohen Energie oberhalb der Zelltodschwelle, sodass die durch die Koagulation entstehenden Vernarbungen ein weiteres Ablösen der Retina verhindern. Da es hierbei jedoch zu einer Zerstörung der Photorezeptoren im behandelten Areal kommt, eignet sich dieses Verfahren nicht für eine Behandlung im Bereich der Makula (Lavinsky et al. 2016). Im Gegensatz dazu ist das Ziel der in dieser Arbeit verwendeten Behandlungen SRT und TSR kein

dauerhafter Schaden, sondern vielmehr eine Stimulation des RPE, weshalb der Einsatz auch im Bereich der Makula denkbar wäre. Für die Durchführung der Laserbehandlungen ist ein bereits in Vorarbeiten (Richert et al. 2018; Tode et al. 2018, 2019) verwendeter Prototyp genutzt worden, sodass die Beurteilung der Organkulturen unter der Spaltlampe und ihre Behandlung bereits etabliert waren. Es wurde zügig gearbeitet, um eine Degeneration der vitalen Zellen zu verhindern und bestmögliche Bedingungen für die nachfolgende Kultivierung in der modifizierten Ussingkammer zu gewährleisten. Zunächst wurde eine Schwellentitration für die Bestimmung der optimalen Behandlungsparameter für beide Behandlungsverfahren durchgeführt. Hierbei wurde für die TSR-Behandlung eine eindeutig unterschwellige Laserleistung (im Mittel 4 % bzw. 5 % Zellschaden) ausgewählt. Dies ist von großem Vorteil für die Behandlung einer AMD, da es nicht zu einer Zerstörung, sondern lediglich zu einer thermischen Stimulation der RPE-Zellen kommen soll (Lavinsky et al. 2016; Tode et al. 2018). Somit ist ohne RPE-Zellschaden eine Behandlung im Bereich der Makula, dem Ort der Pathologie der AMD, denkbar. Die SRT-Behandlung unterscheidet sich von der TSR dadurch, dass eine selektive Zerstörung des RPE gewünscht ist (Brinkmann et al. 2000). Somit wurde in der Titration ein Zellschaden von ca. 50 % angestrebt und die Behandlung mit einer Energiedichte durchgeführt, welche im Mittel zu einem Schaden von 54 % bzw. 47 % geführt hatte. Die umliegenden Zellschichten der Neuroretina, die BrM und die Choroidea bleiben intakt (Roeder et al. 1998; Roeder et al. 1999). Die Zielbereiche der applizierten Energiedichte bzw. Leistung wurden unter der Berücksichtigung der Daten aus am Prototyp durchgeführten Vorarbeiten (Richert et al. 2018) ausgewählt, um die Veränderungen der apikalen Zellmediatorausschüttung mit denen auf der basalen Seite besser vergleichen zu können.

Die Titration erfolgte auch als Anpassung an die genetische Varianz der verwendeten Organkulturen, da eine unterschiedlich starke Pigmentierung der RPE-Zellen Auswirkungen auf die Aufnahme der Laserenergie im RPE und damit auch auf die thermische Stimulation bei der TSR bzw. Zerstörung der RPE-Zellen bei der SRT haben könnte. Dies zeigte sich auch in der Zelltodspanne, welche für die TSR zwischen 0 % und 21 % (100 µm) bzw. 44 % (200 µm) und damit für einzelne Organkulturen deutlich über den unterschwelligen 4 % bzw. 5 % lag. Bei der SRT schwankte der Zellschaden zwischen 10 % und 98 % für 100 µm Spots und zwischen 0 % und 100 % für die 200 µm Spotgröße. Somit werden trotz Titration einige

Organkulturen möglicherweise mit einer zu niedrigen oder zu hohen Energie behandelt. Um diesbezüglich eine Optimierung zu erzielen, wäre in klinischen Studien mit den Laserverfahren SRT und TSR vermutlich eine individuelle Titration erforderlich, z.B. mit Hilfe einer Echtzeit-Temperaturkontrolle (Koinzer et al. 2012).

5.3 Einfluss der Laserbehandlungen auf die apikale Zellmediatorausschüttung im Organkulturmodell

In dieser Arbeit wurde der Einfluss zweier Laserverfahren auf die apikale Ausschüttung von Zellmediatoren untersucht. Die für den Nachweis der Mediatoren durchgeführten ELISA-Tests wurden mit kommerziell erworbenen Test-Kits nach Herstellerangaben durchgeführt. Bei den Ergebnissen finden sich Veränderungen der apikalen Zytokinausschüttung, die sich im Hinblick auf die AMD-Pathogenese als positiv interpretieren lassen, insbesondere vor dem Hintergrund der pathologischen Gefäßneubildungen. Die Induktion des anti-angiogenen Zellmediators PEDF gilt bei CNV im Rahmen der exsudativen Form der AMD als vorteilhaft (Mori et al. 2001) und konnte sowohl nach SRT- als auch nach TSR-Behandlung im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich jedoch nur für die SRT eine deutliche und damit biologisch relevante Erhöhung der PEDF-Ausschüttung für beide Spotgrößen (100 µm und 200 µm). Diesbezüglich ergänzend ist von Vorteil, dass VEGF, welcher als pro-angiogener Gegenspieler von PEDF gilt, durch die Laserbehandlungen nicht induziert wird. Bei der SRT-Behandlung mit 200 µm Spots kommt es sogar zu einer signifikanten Reduktion von VEGF. Diese Beobachtungen decken sich auch mit Erkenntnissen aus vorherigen Arbeiten, die die basale Zellmediator-Ausschüttung nach Laserbehandlungen untersucht haben (Richert et al. 2018; Richert et al. 2020b). So hatte sich für die basale Ausschüttung der Zellmediatoren gezeigt, dass PEDF sowohl durch eine SRT-Behandlung mit 200 µm Spots (Richert et al. 2018) als auch durch eine TSR-Behandlung mit 100 µm und 200 µm Spots auf der basalen Seite der RPE-Zellen induziert werden konnte (Richert et al. 2020b). Für VEGF konnte eine signifikante Reduktion durch eine SRT-Behandlung sowohl mit 100 µm als auch mit 200 µm großen Spots erzielt werden (Richert et al. 2018). In Zusammenschau mit diesen bereits bekannten Daten aus dem basalen Kompartiment lässt sich festhalten, dass die Laserbehandlungen ein

Zytokinprofil induzieren, welches in Bezug auf CNV günstig in die AMD-Pathogenese eingreifen könnte.

In Vorarbeiten mit den Laserverfahren im Mausmodell hat sich außerdem herausgestellt, dass weitere positive Aspekte im Hinblick auf die Pathogenese der AMD vorhanden waren. Es konnte die Reduktion einer verdickten BrM sowohl durch die SRT (Tode et al. 2019) als auch die TSR (Tode et al. 2018) nachgewiesen werden. Legt man bei der Interpretation der apikalen Zellmediatoren den Fokus auf die Frage der Neuroprotektion, haben sowohl VEGF als auch PEDF zahlreiche neuroprotektive Eigenschaften. Sie agieren diesbezüglich daher nicht als Gegenspieler, sondern wirken synergistisch. Für PEDF konnte im Mausmodell ein Schutz vor Apoptose nachgewiesen werden (Wang et al. 2013), was in Bezug auf die Degeneration von Photozezeptoren in der AMD-Pathogenese sehr erfreulich wäre. Ebenfalls wird der Erhalt von Ganglienzellen durch PEDF unterstützt (Unterlauff et al. 2012; Vigneswara u. Ahmed 2019). Somit ist die erhöhte PEDF-Ausschüttung nach apikal und damit in Richtung der Neuroretina ebenfalls als vorteilhaft im Hinblick auf die AMD-Pathogenese einzuordnen. Eine genaue Untersuchung der Auswirkungen der Laserbehandlungen auf die Neuroretina war jedoch in diesem Modell nicht möglich, da der Erhalt dieser in der Kultivierung nicht realisierbar war. Somit sind Rückschlüsse nur indirekt zulässig. Es lässt sich schwer beurteilen, ob die teilweise signifikante Verminderung der VEGF-Ausschüttung einen negativen Einfluss auf die neuroprotektive Zellumgebung hat. Die neuroprotektiven Eigenschaften dieses Faktors liegen u.a. im Schutz der Photorezeptoren vor ischämischen Schädigungen (Nishijima et al. 2007). Daher könnte die signifikante Reduktion von VEGF nach SRT-Behandlung mit 200 µm großen Spots problematisch für den Erhalt der Photorezeptoren sein. Es lässt sich nicht beurteilen inwiefern die vermehrte PEDF-Ausschüttung dies aufwiegt. Jedoch kommt es insbesondere in der AMD-Pathogenese zu einer Überexpression von VEGF und damit zu einer Ausbildung von CNV (Spilsbury et al. 2000). Deshalb könnte die VEGF-Reduktion beim Einsatz der Laserverfahren für die AMD-Behandlung sogar von Vorteil sein, schließlich werden intravitreale Injektionen von VEGF-Inhibitoren (Ferrara u. Adamis 2016) für die Behandlung einer exsudativen Form der AMD durchgeführt. Jedoch kann sich langfristig bei diesen Patienten unter intravitrealen Injektionen von VEGF-Inhibitoren eine Zunahme von Atrophiearealen zeigen (Bhisitkul et al. 2015), was gegebenenfalls auch durch die fehlenden protektiven Eigenschaften des VEGF für die Photorezeptoren (Nishijima et

al. 2007) begünstigt wird. Allerdings sind diese Nebenwirkungen durch die geringe Abnahme von VEGF unter der Laserbehandlung mittels SRT nicht zu erwarten.

Die weiteren untersuchten neuroprotektiven Zellmediatoren BDNF und NGF sind nicht nachgewiesen worden. Somit konnten die Laserbehandlungen die Ausschüttung nicht induzieren, weshalb die protektiven Eigenschaften der Faktoren, die für retinale Ganglienzellen beschrieben worden sind (Chen u. Weber 2001; Guo et al. 2020), leider nicht zum Tragen kommen. Da die Faktoren jedoch auch in den unbehandelten Organkulturüberständen mittels ELISA nicht nachweisbar waren, sind sie für den Erhalt der Neuroretina im gegebenen System vermutlich nicht erforderlich. Daher ist eine fehlende Ausschüttung von BDNF und NGF durch die Laserverfahren nicht zwangsläufig als Nachteil für die Unterstützung der Neuroretina zu sehen und nicht so relevant, wie ein Rückgang der Ausschüttung durch die Laserbehandlungen zu werten wäre. Es bleibt allerdings unklar, ob eine Übertragung auf ein Modell mit vorhandener Neuroretina oder auf den Menschen möglich ist, da die fehlende Ausschüttung auch durch störende Einflussfaktoren des Modells ausgelöst worden sein könnte. Es hat sich in Tiermodellen gezeigt, dass Ratten an Photorezeptoren (Di Polo et al. 2000) und retinalen Ganglienzellen (Jelsma et al. 1993) Rezeptoren für BDNF aufweisen, was nahelegt, dass BDNF doch eine Rolle im Rahmen der Protektion der Neuroretina spielen könnte. Weiterhin wird die Dysregulation von BDNF und NGF als Einflussfaktor auf die AMD-Pathogenese gesehen (Telegina et al. 2019), sodass die Ausschüttung dieser Faktoren abhängig von einer Schädigung der Zellen oder auch altersabhängig sein könnte.

Weiterhin wurde TGF- β ausgetestet. Hierbei zeigte sich keine signifikante Änderung der Ausschüttung zwischen der unbehandelten und der gelaserten Kontrolle. Im Hinblick auf die neuroprotektiven Eigenschaften des Faktors, wie die Verhinderung neuronaler Schädigung im Mausmodell (Brionne et al. 2003), finden sich daher keine protektiven Effekte, jedoch auch keine negativen Auswirkungen, da TGF- β konstant gehalten wird. Beleuchtet man TGF- β unter dem Aspekt der EMT (Kalluri u. Weinberg 2009), lässt sich festhalten, dass es durch das nachgewiesene Zytokinmuster keine Hinweise auf eine Narbenbildung durch die Laserbehandlungen gibt. Da TGF- β jedoch in hohen Konzentrationen im verwendeten Organkulturmedium nachweisbar war, ist eine Beurteilung der Auswirkungen der Laserbehandlungen auf die TGF- β Ausschüttung durch das störende Hintergrundrauschen im ELISA leider nicht adäquat möglich, sodass sich keine finale Aussage über die apikale TGF- β -Ausschüttung

treffen lässt. Vorarbeiten zu der Untersuchung der basalen TGF- β -Sekretion zeigten jedoch keine Änderungen durch die Laserbehandlung (Richert et al. 2020b), obwohl dies bei Laserbehandlungen mit hoher Energie und dementsprechend panretinalem Schaden in der Vergangenheit der Fall war (Ishida et al. 1998; Yamamoto et al. 1998). Für die Beurteilung der Neuroprotektion bei allen untersuchten Zellmediatoren wäre es denkbar, dass sich die Zytokinausschüttung während der Kultivierung in diesem Modell von der *in vivo* unterscheidet, da die Neuroretina bei der Präparation entfernt wurde. Für eine genauere Charakterisierung des Zytokinmilieus und die Wechselwirkungen zwischen RPE und Photorezeptoren wäre die Entwicklung eines Organkulturmodells, dass die Neuroretina miteinschließt, von Vorteil.

5.4 Einfluss der Laserbehandlungen im neuronalen Zellmodell der SH-SY5Y-Zellen

Wie bereits unter 5.1 dargestellt, sind die Vorteile und Limitationen des porcinen Organkulturmodells und der modifizierten Ussingkammern auch für die Interpretation der Experimente im neuronalen Zellmodell zu bedenken. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass es sich bei der SH-SY5Y-Zelllinie um ursprünglich maligne Zellen eines Neuroblastoms handelt (siehe auch 3.1.5). Tumorzellen zeichnen sich durch eine gesteigerte Proliferation, verminderte Apoptose und eine fehlende Differenzierung aus (Lüllmann-Rauch u. Asan 2019). Im Rahmen der Proliferation kann es trotz zahlreicher DNA-Reparaturmechanismen zu einem Auftreten von Mutationen kommen (Negrini et al. 2010), sodass sich zwischen verschiedenen Generationen große Unterschiede ergeben können. Vorteilhaft ist hingegen, dass die Generationendauer kurz ist und man daher in kurzer Zeit eine ausreichende Zellzahl für viele Versuche zu Verfügung hat.

Bei der Kultivierung der Zellen auf 96-Well-Platten kommt es zu einer Ausdifferenzierung der neuronalen Zellmerkmale, sodass die SH-SY5Y-Zellen als Modell für neuronale Zellen genutzt werden können (Biedler et al. 1978; Kovalevich u. Langford 2013). Weiterhin sind sie humanen Ursprungs und relativ leicht zu kultivieren, sodass sich für die Verwendung von SH-SY5Y-Zellen entschieden wurde. Diese wurden mittels Auflichtmikroskopie alle 24 h beobachtet, allerdings wurden keine Differenzierungsmarker bestimmt, sondern nur optische Kriterien verwendet (dreieckige Zellform und Clusterbildung mit Zell-Zell-Kontakten über lange

Zellfortsätze und damit neuronenartiger Phänotyp). Somit lässt sich keine Aussage darüber treffen, ob und inwieweit die Differenzierung der Zelle auf molekulargenetischer Ebene stattgefunden hat. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 48 h und es wurde FCS-haltiges Medium verwendet (KM2, 5 % FCS). Zum Ausschluss von Platteneffekten wurden nur die Zellen aus den Innenwells in spätere Versuche eingeschlossen.

Für den Nachweis eines protektiven Effektes der Organkulturüberstände nach den Laserbehandlungen war die Verwendung von Zellstress notwendig. Im Zellmodell wurde sich für oxidativen Stress als Einflussgröße entschieden, weil dieser in der AMD-Pathogenese eine tragende Rolle spielt (siehe auch 1.1.2) und da er zur Apoptoseinduktion führt (Xiang et al. 2016). Häufig wird für eine Induktion des oxidativen Stresses H_2O_2 genutzt, welcher den oxidativen Stress in der Retina nachahmt (Mitter et al. 2014). Die Apoptose der neuroretinalen Zellen und insbesondere der Photorezeptoren ist bei der Degeneration dieser bei einer fortgeschrittenen AMD ein tragender Mechanismus und führt zu einer Atrophie (Bandello et al. 2017; Bhisitkul et al. 2015), sodass der Schutz neuronaler Zellen vor Apoptose ein wünschenswerter Effekt der Laserbehandlungen wäre. Eine Titration der oxidativen Stressoren war erforderlich, um einen definierten Rückgang der Zellviabilität im MTT-Assay zu erzielen. Es wurden die verschiedenen Stressoren H_2O_2 , TBHP und Erastin miteinander verglichen, um den geeignetsten für dieses Modell zu finden. Erzielt werden sollte ein 50 %-iger Rückgang der Zellviabilität der SH-SY5Y-Zellen im MTT-Assay. In Abhängigkeit vom verwendeten Medium zeigten sich große Unterschiede in der Reaktion auf den oxidativen Stress. Es zeigte sich eine annähernd lineare Stresstitration mit breiter Spanne bei der Titration auf Basis von Organkulturmedium. Es waren große Erhöhungen der Konzentration von H_2O_2 und TBHP nötig, um eine kleine Reduktion der Zellaktivität der SH-SY5Y-Zellen im MTT-Assay auszulösen. Somit war eine hohe Konzentration von H_2O_2 (3.000 μM bzw. 3.500 μM) erforderlich, um einen signifikanten und ausreichend großen Rückgang der Zellaktivität zu erzielen. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Verwendung von Grundmedium ohne FCS, dass deutlich geringere Konzentrationen des oxidativen Stressors erforderlich waren. Eine denkbare Erklärung für die großen Diskrepanzen zwischen der Titration auf Basis von Grundmedium und der auf Organkulturmedium könnte das Vorhandensein von FCS im Organkulturmedium sein. So hat sich FCS in Versuchen mit Pankreas-Inselzellen neugeborener Ratten als protektiv gegen

oxidativen Stress erwiesen (Stoppiglia et al. 2002). Außerdem konnte in Vorarbeiten aus FCS Serofensäure extrahiert werden, welche kultivierte Neurone vor der Zytotoxizität von Glutamat, Stickoxid und oxidativem Stress schützte (Kume et al. 2002). Eine weitere Arbeit hat Serofensäure als protektiv gegen oxidativen Stress in neonatalen Ratten-Herzmuskelzellen herausgestellt (Takeda et al. 2006). Somit ist denkbar, dass es durch die Verwendung von FCS-haltigem Medium zu einem Schutz der neuronalen Zellen und damit einer erhöhten Stressresistenz gekommen ist. Zu dieser Vermutung passt ebenfalls das Ergebnis, dass der Rückgang der Zellviabilität durch den oxidativen Stress bei einer vorherigen Kultivierung der SH-SY5Y-Zellen über 96 h mit 10 % FCS im Vergleich zu 5 % FCS nicht mehr signifikant ausfiel (siehe auch 4.3.3 und Abb. 17). Der Einflussfaktor FCS konnte jedoch nicht ausgeklammert werden, da die generierten Überstände aus den Organkulturversuchen als Basis Organkulturmedium mit ca. 10 % FCS hatten, um die bestmöglichen Überlebenseigenschaften der Organkulturen über die dreitägige Kultivierung in der modifizierten Ussingkammer zu erreichen.

Für die Auswertung der Zellviabilität wurde auf einen MTT-Assay (siehe auch 3.2.7) zurückgegriffen, welcher über die Reduktion von NADH⁺, NADPH und Succinat ein Maß für die Glykolyserate der Zellen darstellt (Mosmann 1983). Die Auswertung erfolgte durch die photometrische Messung des Farbumschlags. Lange Zeit galt er aufgrund seiner hohen Sensitivität als Goldstandard (van Tonder et al. 2015), weiterhin ist er günstig und leicht verfügbar. Aufgrund dessen wurde er als Maß für die Zellviabilität der SH-SY5Y-Zellen ausgewählt. Jedoch weist der MTT-Assay einige Limitationen auf, da Interferenzen zwischen Glykolyseinhibitoren und dem Assay auftreten können (van Tonder et al. 2015).

Die Experimente mit den Organkulturüberständen wurden nach einem randomisierten Schema auf die 96-Well-Platte aufgetragen, um Platteneffekte auszuschließen. Die Randwells wurden nicht in die Betrachtung mit einbezogen. Unter dem Aspekt der Neuroprotektion kann festgehalten werden, dass für die durchgeführten Laserbehandlungen keine negativen Auswirkungen auf die Zellviabilität der SH-SY5Y-Zellen durch das induzierte apikale Zytokinprofil charakterisiert werden konnten. Es hat sich ein signifikanter Effekt auf die Zellviabilität nach der Behandlung mit den TSR 200 µm Überständen von Tag eins und Tag drei nach 24 h Inkubation herausgestellt. Dies konnte jedoch nicht bei einer Vorinkubation von nur 1 h nachgewiesen werden, sodass man für die Erzielung des protektiven Effektes eine ausreichend lange

Inkubationszeit mit den Überständen benötigt. Somit hatte eine TSR-Behandlung mit 200 µm Spots einen förderlichen und unterstützenden Effekt auf den Erhalt der neuronalen Zellen im Zellkulturmodell. Dies liefert indirekt einen Hinweis auf Neuroprotektion, da es zu einer geringeren Empfindlichkeit der SH-SY5Y auf oxidativen Stress durch H₂O₂ gekommen ist. Möglicherweise ist dies auf den Erhalt der Neuroretina übertragbar, jedoch wäre für eine bessere Beurteilung der Auswirkungen auf die Neuroretina die Erprobung der Laserbehandlung in einem neuroretinalen Zellmodell oder in einem Organkulturmodell, was die Neuroretina mit einschließt, erforderlich.

Es bleibt unklar, welche Mechanismen der TSR-Behandlung bzw. Faktoren im Organkulturüberstand nach TSR-Behandlung zu einer erhöhten Resistenz der SH-SY5Y-Zellen gegenüber oxidativem Stress durch H₂O₂ geführt haben. Denkbar wäre, dass die Unterdrückung einer Entzündungsreaktionen einen Tag nach TSR-Behandlung (Richert et al. 2020a) oder auch durch die Aktivierung von Hitzeschockproteinen in RPE-Zellen (Sramek et al. 2011) eine mögliche Erklärung liefert.

Bei den 100 µm Spots der TSR konnte kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden. Ebenfalls hatte die Behandlung mittels SRT keinen signifikanten Einfluss auf die Stressresistenz der SH-SY5Y-Zellen. Dies könnte darin begründet sein, dass es nach einer SRT-Behandlung durch die selektive Zerstörung der RPE-Zellen kurzzeitig zu einer proinflammatorischen Reaktion kommt (Richert et al. 2020a). Diese ist für das Abräumen der Zelltrümmer und für die Regeneration erforderlich. Diese Entzündungsprozesse, wie beispielsweise die Erhöhung bestimmter Interleukine durch die SRT (Richert et al. 2020a), können das Überleben von neuronalen Zellen beeinflussen (Liao et al. 2019). In Zusammenschau mit bereits bekannten weiteren Eigenschaften der TSR wie einer Reduktion der Dicke der BrM (Tode et al. 2018) hat eine TSR-Behandlung das Potential einer Therapieoption der AMD.

5.5 Fazit und Zukunftsaussicht

Trotz einiger Limitationen der durchgeführten Versuche zeigten sich dennoch eindeutige Effekte auf die apikale Zellmediatorausschüttung. So kam es zu einer Erhöhung der PEDF-Ausschüttung und teilweise zu einer Verminderung der VEGF-

Ausschüttung. Im neuronalen Zellkulturmodell zeigten sich neuroprotektive Effekte im Hinblick auf die Stressresistenz durch die TSR-Behandlung.

Die verwendeten Laserverfahren SRT und TSR konnten im Hinblick auf eine mögliche Therapieoption der frühen Form der AMD weiter charakterisiert werden. Durch ihre unterschiedliche Wirkweise auf das RPE (selektive Zerstörung vs. thermische Stimulation) ergeben sich auch einige Unterschiede in der Wirkweise. So zeigte sich in der apikalen Zellmediatorkausschüttung nach SRT für beide Spotgrößen ein signifikanter PEDF-Anstieg und für die 200 µm großen Spots ein signifikanter VEGF-Rückgang, wohingegen nach einer TSR-Behandlung nur eine signifikante Erhöhung der PEDF-Ausschüttung für die 100 µm Spots auftrat, welche jedoch sehr gering ausfiel. Daher lässt sich festhalten, dass die SRT größere Effekte auf die Ausschüttung der untersuchten apikalen Zellmediatoren auslöste. In der indirekten Austestung der Neuroprotektion im neuronalen Zellmodell konnte jedoch nur die TSR-Behandlung signifikante Effekte auf die Stressresistenz der SH-SY5Y-Zellen verzeichnen.

Es sind für die Bestimmung der neuroprotektiven Substanzen, welche nach apikal vom RPE ausgeschüttet werden, weitere Untersuchungen erforderlich. Herausgearbeitet werden konnte bereits, dass BDNF und NGF im verwendeten porcinen Organkulturmodell keine Rolle spielen. Daher sollten gegebenenfalls weitere neuroprotektive Faktoren ausgetestet werden und eine Untersuchung möglichst in einem Modell erfolgen, welches die Neuroretina miteinschließt. Denkbar wäre hier entweder wieder eine Organkultur oder ein Tiermodell. Im weiteren Verlauf sollte die Durchführung von klinischen Studien erfolgen, um die Laserverfahren SRT und TSR in ihrem therapeutischen Potential für eine Behandlung von Netzhauterkrankungen wie der AMD näher zu charakterisieren.

Auch in der Zusammenschau mit bereits durchgeführten Untersuchungen zu der basalen Zellmediatorkausschüttung im porcinen Organkulturmodell (Richert et al. 2018; Richert et al. 2020b) und der Charakterisierung der Laserverfahren im Mausmodell (Tode et al. 2018, 2019; Richert et al. 2020a) bleiben SRT und TSR weiterhin vielversprechende potentielle Ansätze für die nicht-exsudative AMD und insbesondere für frühe Stadien. Jedoch ist weiterhin großes Forschungspotential für eine weitere Beurteilung der schonenden Laserbehandlungen SRT und TSR gegeben, um die Weiterentwicklung bis hin zu einer frühen Therapieoption für AMD-Patienten zu ermöglichen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist die häufigste Erblindungsursache älterer Menschen in Industrienationen. Die multifaktorielle Pathogenese ist noch nicht vollständig verstanden. Unter anderem kommt es zu Ablagerungen und zu einer Verdickung der Bruch'schen Membran (BrM), was zu der Degeneration der Zellen des Retinalen Pigmentepithels (RPE) und der Photorezeptoren und damit für die Patienten zu einem Visusverlust führt.

Im Rahmen der Entwicklung neuer Therapieansätze für die AMD wurden die Laserverfahren Selektive Retinatherapie (SRT) und Thermische Stimulation der Retina (TSR) hinsichtlich ihrer Wirkung auf die RPE-Zellen in einem procinen Organkulturmodell des RPE-Choroidea-Komplexes charakterisiert. Im Fokus des Projektes stand eine mögliche neuroprotektive Wirkung der Laserverfahren. Es wurde die apikale Sekretion der Wachstumsfaktoren *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Pigment Epithelium-Derived Factor* (PEDF), *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), *Nerve Growth Factor* (NGF) und *Transforming Growth Factor beta* (TGF- β) untersucht. Darüber hinaus wurde getestet, wie sich die gelaserten Organkulturüberstände auf die Resistenz gegen oxidativen Stress durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in einem neuronalen Zellmodell aus SH-SY5Y-Zellen auswirken.

Die SRT zerstört selektiv die Zellen des RPE, wohingegen die umliegenden Zellen intakt bleiben. Nach der Laserbehandlung kommt es zu der Regeneration des RPE durch Migration und Mitose der Zellen. Bei der TSR-Behandlung kommt es durch die erzeugte Hyperthermie zu einer Aktivierung der RPE-Zellen, jedoch ohne diese zu zerstören (subletale Behandlung).

Es wurde mit einem 532 nm Neodymium-doped:Yttrium-Aluminium-Granat (Nd:YAG) Laser behandelt. Für die SRT kam ein gepulster Modus zum Einsatz (532 nm, 300 ms Dauer, Energie 205 mJ/cm² bzw. 140 mJ/cm², 100 Hz, Pulslänge 1,4 μ s), bei der TSR wurde ein *continuous wave*-Modus (532 nm, 100 ms Dauer, Leistung 15 mW bzw. 22 mW) genutzt. Für beide Modi wurden 100 μ m und 200 μ m große Spots verwendet. Die Organkulturen wurden für drei Tage in modifizierten Ussingkammern kultiviert, bei denen zwischen apikaler und basolateraler Proteinsekretion unterschieden werden kann. Nach der Kultivierung wurde die Vitalität des RPE überprüft und die oben genannten Faktoren in einem *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

nachgewiesen. Als Referenz diente eine unbehandelte Kontrolle aus demselben Auge. Für das neuronale Zellmodell wurden SH-SY5Y-Zellen für 96 Stunden auf 96-Well-Platten kultiviert, mit den Organkulturüberständen inkubiert und dann oxidativem Stress ausgesetzt.

Der neuroprotektive Zellmediator PEDF wurde durch die SRT-Behandlungen und durch die TSR-Behandlung mit 100 µm Spotgröße signifikant induziert. Für VEGF zeigte sich eine signifikante Reduktion der Ausschüttung nach SRT-Behandlung mit 200 µm Spots. Die neuronalen Wachstumsfaktoren BDNF und NGF wurden von unbehandelten und gelaserten RPE-Zellen in diesem Modell nicht nach apikal ausgeschüttet. Die TGF-β Ausschüttung nach apikal wurde durch die Laserbehandlungen nicht beeinflusst.

Im neuronalen Zellmodell konnte ein positiver Effekt der TSR-Behandlung mit 200 µm Spots auf die Stressresistenz der SH-SY5Y-Zellen nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass beide Laserverfahren neuroprotektive Effekte auslösen konnten und das erzeugte Zytokinprofil im Rahmen der AMD-Pathogenese als vorteilhaft anzusehen ist.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Aisenbrey** S, Zhang M, Bacher D, Yee J, Brunken WJ, Hunter DD (2006) Retinal pigment epithelial cells synthesize laminins, including laminin 5, and adhere to them through alpha3- and alpha6-containing integrins. *Investigative ophthalmology & visual science* 47: 5537–5544.
- AREDS Report Nr. 8 (2001) A Randomized, Placebo-Controlled, Clinical Trial of High-Dose Supplementation With Vitamins C and E, Beta Carotene, and Zinc for Age-Related Macular Degeneration and Vision Loss. *Archives of ophthalmology* (Chicago, Ill. 1960) 119.
- Aydin S (2015) A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* 72: 4–15.
- Bandello** F, Sacconi R, Querques L, Corbelli E, Cicinelli MV, Querques G (2017) Recent advances in the management of dry age-related macular degeneration: A review. *F1000Research* 6: 245.
- Bhisitkul RB, Mendes TS, Rofagha S, Enanoria W, Boyer DS, Sadda SR, Zhang K (2015) Macular atrophy progression and 7-year vision outcomes in subjects from the ANCHOR, MARINA, and HORIZON studies: The SEVEN-UP study. *American journal of ophthalmology* 159: 915-24.e2.
- Bhutto I, Luty G (2012) Understanding age-related macular degeneration (AMD): Relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Molecular aspects of medicine* 33: 295–317.
- Bhutto IA, McLeod DS, Hasegawa T, Kim SY, Merges C, Tong P, Luty GA (2006) Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related macular degeneration. *Experimental eye research* 82: 99–110.
- Biedler JL, Helson L, Spengler BA (1973) Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture. *Cancer research*.
- Biedler JL, Roffler-Tarlov Suzanne, Schachner M, Freedman LS (1978) Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones. *Cancer research*.
- Bok D (1993) The retinal pigment epithelium: A versatile partner in vision. *J. Cell Sci. Suppl.* 17: 189–195.
- Brinkmann R, Hüttmann G, Rögener J, Roider J, Birngruber R, Lin CP (2000) Origin of retinal pigment epithelium cell damage by pulsed laser irradiance in the nanosecond to microsecond time regimen. *Lasers in surgery and medicine* 27: 451–464.
- Brionne TC, Tesseur I, Masliah E, Wyss-Coray T (2003) Loss of TGF-beta 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain. *Neuron* 40: 1133–1145.
- Carmeliet** P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380: 435–439.
- Chen H, Weber AJ (2001) BDNF enhances retinal ganglion cell survival in cats with optic nerve damage. *Investigative ophthalmology & visual science* 42: 966–974.
- Chen L, Miyamura N, Ninomiya Y, Handa JT (2003) Distribution of the collagen IV isoforms in human Bruch's membrane. *The British journal of ophthalmology* 87: 212–215.

- Chen M, Luo C, Zhao J, Devarajan G, Xu H (2019) Immune regulation in the aging retina. *Progress in retinal and eye research* 69: 159–172.
- Chong V (2016) Ranibizumab for the treatment of wet AMD: A summary of real-world studies. *Eye (London, England)* 30: 1526.
- Colucci-D'Amato L, Speranza L, Volpicelli F (2020) Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. *International journal of molecular sciences* 21.
- Curcio CA (2018) Soft Drusen in Age-Related Macular Degeneration: Biology and Targeting Via the Oil Spill Strategies. *Investigative ophthalmology & visual science* 59: AMD160-AMD181.
- Curcio CA, Johnson M, Rudolf M, Huang J-D (2011) The oil spill in ageing Bruch membrane. *The British journal of ophthalmology* 95: 1638–1645.
- Datta** S, Cano M, Ebrahimi K, Wang L, Handa JT (2017) The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD. *Progress in retinal and eye research* 60: 201–218.
- Di Polo A, Cheng L, Bray GM, Aguayo AJ (2000) Colocalization of TrkB and brain-derived neurotrophic factor proteins in green-red-sensitive cone outer segments. *Investigative ophthalmology & visual science* 41: 4014–4021.
- Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, Morrison B, Stockwell BR (2012) Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Non-Apoptotic Cell Death. *Cell* 149: 1060–1072.
- Erke** MG, Bertelsen G, Peto T, Sjølie AK, Lindekleiv H, Njølstad I (2014) Cardiovascular risk factors associated with age-related macular degeneration: The Tromsø Study. *Acta ophthalmologica* 92: 662–669.
- Eysel U (2010) Sehsystem und Augenbewegungen. In: Klinke R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S (Hrsg.) *Physiologie*: Thieme, Stuttgart, S 708–739.
- Ferrara** N (2016) VEGF and Intraocular Neovascularization: From Discovery to Therapy. *Translational vision science & technology* 5: 10.
- Ferrara N, Adamis AP (2016) Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nature reviews. Drug discovery* 15: 385–403.
- Ferris FL, Wilkinson CP, Bird A, Chakravarthy U, Chew E, Csaky K, Sadda SR (2013) Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 120: 844–851.
- Foxton RH, Finkelstein A, Vijay S, Dahlmann-Noor A, Khaw PT, Morgan JE, Shima DT, Ng Y-S (2013) VEGF-A is necessary and sufficient for retinal neuroprotection in models of experimental glaucoma. *The American journal of pathology* 182: 1379–1390.
- Framme C, Greb O, Bayer S, Buley P, Pielen A, Hufendiek K, Junker B, Volkmann I (2020) Entwicklung eines patientennahen Organisationsmanagements für die intravitreale Injektionstherapie in einem standardisierten „Treat-and-Extend“-Regime an einer Universitäts-Augenklinik. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*.
- Fritsche LG, Igl W, Bailey JNC, Grassmann F, Sengupta S, Bragg-Gresham JL, Burdon KP, Hebbaring SJ, Wen C, Gorski M, Kim IK, Cho D, Zack D, Souied E, Scholl HPN, Bala E, Lee KE, Hunter DJ, Sardell RJ, Mitchell P, Merriam JE, Cipriani V, Hoffman JD, Schick T, Lechanteur YTE, Guymer RH, Johnson MP, Jiang Y, Stanton CM, Buitendijk GHS, 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, Strachwitz CN von, 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 J-A, 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 J-F, Igo RP, 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, Agarwal A, Ersoy L, Caramoy A, Langmann T, Saksens NTM, Jong EK de, Hoyng CB, Cain MS, Richardson AJ, Martin TM, Blangero J, Weeks DE, Dhillon B, van Duijn CM, Doheny KF, Romm J, Klaver CCW, Hayward C, Gorin MB, Klein ML, Baird PN, den Hollander AI, Fauser S, Yates JRW, Allikmets R, Wang JJ, Schaumberg DA, Klein BEK, Hagstrom SA, Chowers I, Lotery AJ, Léveillard T, Zhang K, Brilliant MH, Hewitt AW, Swaroop A, Chew EY, Pericak-Vance MA, DeAngelis M, Stambolian D, Haines JL, Iyengar SK, Weber BHF, Abecasis GR, Heid IM (2016) A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. *Nature genetics* 48: 134–143.
- Guo** L, Davis BM, Ravindran N, Galvao J, Kapoor N, Haamedi N, Shamsheer E, Luong V, Fico E, Cordeiro MF (2020) Topical recombinant human Nerve growth factor (rh-NGF) is neuroprotective to retinal ganglion cells by targeting secondary degeneration. *Scientific reports* 10: 3375.
- Heier** JS, Brown DM, Chong V, Korobelnik J-F, Kaiser PK, Nguyen QD, Kirchhof B, Ho A, Ogura Y, Yancopoulos GD, Stahl N, Vitti R, Berliner AJ, Soo Y, Anderesi M, Groetzbach G, Sommerauer B, Sandbrink R, Simader C, Schmidt-Erfurth U (2012) Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 119: 2537–2548.
- Hewitt AT, Nakazawa K, Newsome DA (1989) Analysis of Newly Synthesized Bruch's Membrane Proteoglycans. *Investigative ophthalmology & visual science*.
- Hollyfield JG, Bonilha VL, Rayborn ME, Yang X, Shadrach KG, Lu L, Ufret RL, Salomon RG, Perez VL (2008) Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration. *Nature medicine* 14: 194–198.
- Ishida** K, Yoshimura N, Yoshida M, Honda Y (1998) Upregulation of transforming growth factor-beta after panretinal photocoagulation. *Investigative ophthalmology & visual science* 39: 801–807.
- Jelsma** TN, Friedman HH, Berkelaar M, Bray GM, Aguayo AJ (1993) Different forms of the neurotrophin receptor trkB mRNA predominate in rat retina and optic nerve. *Journal of neurobiology* 24: 1207–1214.
- Kalluri** R, Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* 119: 1420–1428.
- Kanski JJ, Bowling B (2012) *Klinische Ophthalmologie*. Urban & Fischer in Elsevier, München.
- Kauppinen A, Paterno JJ, Blasiak J, Salminen A, Kaarniranta K (2016) Inflammation and its role in age-related macular degeneration. *Cellular and molecular life sciences CMLS* 73: 1765–1786.
- Khalin I, Alyautdin R, Kocherga G, Bakar MA (2015) Targeted delivery of brain-derived neurotrophic factor for the treatment of blindness and deafness. *International journal of nanomedicine* 10: 3245–3267.
- Klettner A (2012) Oxidative stress induced cellular signaling in RPE cells. *Front Biosci (Schol Ed)* 4: 392–411.

- Klettner A (2015) Altersabhängige Makuladegeneration (AMD). *Biologie und Behandlung. Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten* 38: 258-64; quiz 265-6.
- Kneubühl FK, Sigrist MW (2008) *Laser*. Vieweg + Teubner, Wiesbaden.
- Koinzer S, Schlott K, Ptaszynski L, Bever M, Kleemann S, Saeger M, Baade A, Caliebe A, Miura Y, Birngruber R, Brinkmann R, Roider J (2012) Temperature-controlled retinal photocoagulation--a step toward automated laser treatment. *Investigative ophthalmology & visual science* 53: 3605–3614.
- Kovalevich J, Langford D (2013) Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1078: 9–21.
- Kume T, Asai N, Nishikawa H, Mano N, Terauchi T, Taguchi R, Shirakawa H, Osakada F, Mori H, Asakawa N, Yonaga M, Nishizawa Y, Sugimoto H, Shimohama S, Katsuki H, Kaneko S, Akaike A (2002) Isolation of a diterpenoid substance with potent neuroprotective activity from fetal calf serum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 3288–3293.
- Lakkaraju** A, Umapathy A, Tan LX, Daniele L, Philp NJ, Boesze-Battaglia K, Williams DS (2020) The cell biology of the retinal pigment epithelium. *Progress in retinal and eye research*: 100846.
- Lambrechts D, Störkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van Marion I, Al-Chalabi A, Bornes S, Musson R, Hansen V, Beckman L, Adolfsson R, Pall HS, Prats H, Vermeire S, Rutgeerts P, Katayama S, Awata T, Leigh N, Lang-Lazdunski L, Dewerchin M, Shaw C, Moons L, Vlietinck R, Morrison KE, Robberecht W, van Broeckhoven C, Collen D, Andersen PM, Carmeliet P (2003) VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nature genetics* 34: 383–394.
- Lang GE, Lang GK (2019) Netzhaut (Retina). In: Lang GK, Esser Joachim, Gareis O, Lang GE, Lang SE, Spraul CW, Wagner P (Hrsg.) *Augenheilkunde*: Thieme, Stuttgart, S 224–271.
- Lavinsky D, Palanker D (2015) Nondamaging photothermal therapy for the retina: Initial clinical experience with chronic central serous retinopathy. *Retina (Philadelphia, Pa.)* 35: 213–222.
- Lavinsky D, Wang J, Huie P, Dalal R, Lee SJ, Lee DY, Palanker D (2016) Nondamaging Retinal Laser Therapy: Rationale and Applications to the Macula. *Investigative ophthalmology & visual science* 57: 2488–2500.
- Lee Y, Hussain AA, Seok J-H, Kim S-H, Marshall J (2015) Modulating the Transport Characteristics of Bruch's Membrane With Steroidal Glycosides and its Relevance to Age-Related Macular Degeneration (AMD). *Investigative ophthalmology & visual science* 56: 8403–8418.
- Li JQ, Welchowski T, Schmid M, Mauschitz MM, Holz FG, Finger RP (2020a) Prevalence and incidence of age-related macular degeneration in Europe: A systematic review and meta-analysis. *The British journal of ophthalmology* 104: 1077–1084.
- Li R, Li D-H, Zhang H-Y, Wang J, Li X-K, Xiao J (2020b) Growth factors-based therapeutic strategies and their underlying signaling mechanisms for peripheral nerve regeneration. *Acta pharmacologica Sinica* 41: 1289–1300.
- Li S, Gu X, Yi S (2017) The Regulatory Effects of Transforming Growth Factor- β on Nerve Regeneration. *Cell transplantation* 26: 381–394.

- Liao Y, Zhang H, He D, Wang Y, Cai B, Chen J, Ma J, Liu Z, Wu Y (2019) Retinal Pigment Epithelium Cell Death Is Associated With NLRP3 Inflammasome Activation by All-trans Retinal. *Investigative ophthalmology & visual science* 60: 3034–3045.
- Linsenmeier RA, Braun RD (1992) Oxygen distribution and consumption in the cat retina during normoxia and hypoxemia. *The Journal of general physiology* 99: 177–197.
- Lüllmann-Rauch R, Asan E (2019) Taschenlehrbuch Histologie. Thieme, Stuttgart.
- Mantel** P-Y, Schmidt-Weber CB (2011) Transforming growth factor-beta: Recent advances on its role in immune tolerance. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 677: 303–338.
- Martin DF, Maguire MG, Ying G-s, Grunwald JE, Fine SL, Jaffe GJ (2011) Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine* 364: 1897–1908.
- Martín C, Martínez R, Navarro R, Ruiz-Sanz JI, Lacort M, Ruiz-Larrea MB (2001) tert-Butyl hydroperoxide-induced lipid signaling in hepatocytes: Involvement of glutathione and free radicals. *Biochemical pharmacology* 62: 705–712.
- Medawar PB (1948) Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *British journal of experimental pathology* 29: 58–69.
- Middleton S (2010) Porcine ophthalmology. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 26: 557–572.
- Mitter SK, Song C, Qi X, Mao H, Rao H, Akin D, Lewin A, Grant M, Dunn W, Ding J, Bowes Rickman C, Boulton M (2014) Dysregulated autophagy in the RPE is associated with increased susceptibility to oxidative stress and AMD. *Autophagy* 10: 1989–2005.
- Mori K, Duh E, Gehlbach P, Ando A, Takahashi K, Pearlman J, Yang HS, Zack DJ, Etyreddy D, Brough DE, Wei LL, Campochiaro PA (2001) Pigment epithelium-derived factor inhibits retinal and choroidal neovascularization. *Journal of cellular physiology* 188: 253–263.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65: 55–63.
- Müller-Esterl W (2018) Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler - Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kerscher, Stefan Kieß und Katrin Ridinger. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
- Neelam** K, Goenadi CJ, Lun K, Yip CC, Au Eong K-G (2017) Putative protective role of lutein and zeaxanthin in diabetic retinopathy. *The British journal of ophthalmology* 101: 551–558.
- Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD (2010) Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11: 220–228.
- Neri S, Mariani E, Meneghetti A, Cattini L, Facchini A (2001) Calcein-Acetyoxymethyl Cytotoxicity Assay: Standardization of a Method Allowing Additional Analyses on Recovered Effector Cells and Supernatants. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 8: 1131–1135.
- Nickla DL, Wallman J (2010) The multifunctional choroid. *Progress in retinal and eye research* 29: 144–168.
- Nishijima K, Ng Y-S, Zhong L, Bradley J, Schubert W, Jo N, Akita J, Samuelsson SJ, Robinson GS, Adamis AP, Shima DT (2007) Vascular endothelial growth factor-A is a survival factor for retinal neurons and a critical neuroprotectant during the

- adaptive response to ischemic injury. *The American journal of pathology* 171: 53–67.
- Ozawa Y**, Sasaki M, Takahashi N, Kamoshita M, Miyake S, Tsubota K (2012) Neuroprotective effects of lutein in the retina. *Current pharmaceutical design* 18: 51–56.
- Palasz E**, Wysocka A, Gasiorowska A, Chalimoniuk M, Niewiadomski W, Niewiadomska G (2020) BDNF as a Promising Therapeutic Agent in Parkinson's Disease. *International journal of molecular sciences* 21.
- Pang I-H, Zeng H, Fleenor DL, Clark AF (2007) Pigment epithelium-derived factor protects retinal ganglion cells. *BMC neuroscience* 8: 11.
- Papenkort J, Richert, Elisabeth Volkmann, Ingo, Hösel K, Dörschmann P, Roider J, Klettner A, Tode J (2021) Neuroprotective Effects of Thermal Stimulation of the Retina and Selective Retina Therapy Implications for the Treatment of Macular Disease. *JSM Ophthalmology*.
- Park WH (2013) The effect of MAPK inhibitors and ROS modulators on cell growth and death of H₂O₂-treated HeLa cells. *Molecular Medicine Reports* 8: 557–564.
- Pauleikhoff D, Zuels S, Sheridah GS, Marshall J, Wessing A, Bird AC (1992) Correlation between biochemical composition and fluorescein binding of deposits in Bruch's membrane. *Ophthalmology* 99: 1548–1553.
- Pons M, Marin-Castaño ME (2011) Nicotine increases the VEGF/PEDF ratio in retinal pigment epithelium: A possible mechanism for CNV in passive smokers with AMD. *Investigative ophthalmology & visual science* 52: 3842–3853.
- Rapino C**, Tortolani D, Scipioni L, Maccarrone M (2018) Neuroprotection by (endo)Cannabinoids in Glaucoma and Retinal Neurodegenerative Diseases. *Current neuropharmacology* 16: 959–970.
- Richert E, Burchard C von der, Klettner A, Arnold P, Lucius R, Brinkmann R, Roider J, Tode J (2020a) Modulation of inflammatory processes by thermal stimulating and RPE regenerative laser therapies in age related macular degeneration mouse models. *Cytokine: X* 2: 100031.
- Richert E, Koinzer S, Tode J, Schlott K, Brinkmann R, Hillenkamp J, Klettner A, Roider J (2018) Release of Different Cell Mediators During Retinal Pigment Epithelium Regeneration Following Selective Retina Therapy. *Investigative ophthalmology & visual science* 59: 1323–1331.
- Richert E, Papenkort J, Burchard C von der, Klettner A, Arnold P, Lucius R, Brinkmann R, Framme C, Roider J, Tode J (2021) Selective retina therapy and thermal stimulation of the retina: Different regenerative properties - implications for AMD therapy. *BMC Ophthalmology* 21: 742.
- Richert E, Papenkort J, Klettner A, Tode J, Koinzer S, Brinkmann R, Fink C, Roeder T, Lucius R, Roider J (2020b) Response of Retinal Pigment Epithelium (RPE)-Choroid Explants to Thermal Stimulation Therapy of the RPE (TSR). *Lasers in surgery and medicine*.
- Roider J (2006) Selektive Retina Therapie – SRT. *Der Ophthalmologe* 103: 837–838.
- Roider J, Brinkmann R, Wirbelauer C, Laqua H, Birngruber R (1999) Retinal sparing by selective retinal pigment epithelial photocoagulation. *Arch. Ophthalmol.* 117: 1028–1034.
- Roider J, El Hifnawi ES, Birngruber R (1998) Bubble formation as primary interaction mechanism in retinal laser exposure with 200-ns laser pulses. *Lasers in surgery and medicine* 22: 240–248.
- Schnichels S**, Paquet-Durand F, Löscher M, Tsai T, Hurst J, Joachim SC, Klettner A (2021) Retina in a dish: Cell cultures, retinal explants and animal models for common diseases of the retina. *Progress in retinal and eye research* 81: 100880.

- Schrader WF (2006) Altersbedingte Makuladegeneration: Sozioökonomische Zeitbombe in der alternden Gesellschaft. *Der Ophthalmologe Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 103: 742–748.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359: 843–845.
- Sparrow JR, Parish CA, Hashimoto M, Nakanishi K (1999) A2E, a Lipofuscin Fluorophore, in Human Retinal Pigmented Epithelial Cells in Culture. *Investigative ophthalmology & visual science*.
- Spilsbury K, Garrett KL, Shen WY, Constable IJ, Rakoczy PE (2000) Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinal pigment epithelium leads to the development of choroidal neovascularization. *The American journal of pathology* 157: 135–144.
- Sramek C, Mackanos M, Spitler R, Leung L-S, Nomoto H, Contag CH, Palanker D (2011) Non-damaging retinal phototherapy: Dynamic range of heat shock protein expression. *Investigative ophthalmology & visual science* 52: 1780–1787.
- Stoppiglia LF, Nogueira TA, Leite AR, Carneiro EM, Boschero AC (2002) Protective effect of D-glucose, L-leucine and fetal calf serum against oxidative stress in neonatal pancreatic islets. *Biochimica et biophysica acta* 1588: 113–118.
- Strauss O (2005) The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological reviews* 85: 845–881.
- Sui G-Y, Liu G-C, Liu G-Y, Gao Y-Y, Deng Y, Wang W-Y, Tong S-H, Wang L (2013) Is sunlight exposure a risk factor for age-related macular degeneration? A systematic review and meta-analysis. *The British journal of ophthalmology* 97: 389–394.
- Svensson B, Peters M, König H-G, Poppe M, Levkau B, Rothermundt M, Arolt V, Kögel D, Prehn JHM (2002) Vascular endothelial growth factor protects cultured rat hippocampal neurons against hypoxic injury via an antiexcitotoxic, caspase-independent mechanism. *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 22: 1170–1175.
- Takeda** T, Akao M, Matsumoto-Ida M, Kato M, Takenaka H, Kihara Y, Kume T, Akaike A, Kita T (2006) Serofendic acid, a novel substance extracted from fetal calf serum, protects against oxidative stress in neonatal rat cardiac myocytes. *Journal of the American College of Cardiology* 47: 1882–1890.
- Taylor DJ, Hobby AE, Binns AM, Crabb DP (2016) How does age-related macular degeneration affect real-world visual ability and quality of life? A systematic review. *BMJ open* 6: e011504.
- Telegina DV, Kolosova NG, Kozhevnikova OS (2019) Immunohistochemical localization of NGF, BDNF, and their receptors in a normal and AMD-like rat retina. *BMC medical genomics* 12: 48.
- Tode J, Richert E, Koinzer S, Klettner A, Burchard C von der, Brinkmann R, Lucius R, Roeder J (2018) Thermal Stimulation of the Retina Reduces Bruch's Membrane Thickness in Age Related Macular Degeneration Mouse Models. *Translational vision science & technology* 7: 2.
- Tode J, Richert E, Koinzer S, Klettner A, Burchard C von der, Brinkmann R, Lucius R, Roeder J (2019) Selective Retina Therapy Reduces Bruch's Membrane Thickness and Retinal Pigment Epithelium Pathology in Age-Related Macular Degeneration Mouse Models. *Translational vision science & technology* 8: 11.

- Tombran-Tink J, Chader GG, Johnson LV (1991) PEDF: A pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Experimental eye research* 53: 411–414.
- Tonnesen MG, Feng X, Clark RA (2000) Angiogenesis in wound healing. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings* 5: 40–46.
- Treumer F, Klettner A, Baltz J, Hussain AA, Miura Y, Brinkmann R, Roider J, Hillenkamp J (2012) Vectorial release of matrix metalloproteinases (MMPs) from porcine RPE-choroid explants following selective retina therapy (SRT): Towards slowing the macular ageing process. *Experimental eye research* 97: 63–72.
- Unterlauff** JD, Eichler W, Kuhne K, Yang XM, Yafai Y, Wiedemann P, Reichenbach A, Claudepierre T (2012) Pigment epithelium-derived factor released by Müller glial cells exerts neuroprotective effects on retinal ganglion cells. *Neurochemical research* 37: 1524–1533.
- van Tonder** A, Joubert AM, Cromarty AD (2015) Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC research notes* 8: 47.
- Vigneswara V, Ahmed Z (2019) Pigment epithelium-derived factor mediates retinal ganglion cell neuroprotection by suppression of caspase-2. *Cell death & disease* 10: 102.
- Wang** Y, Subramanian P, Shen D, Tuo J, Becerra SP, Chan C-C (2013) Pigment epithelium-derived factor reduces apoptosis and pro-inflammatory cytokine gene expression in a murine model of focal retinal degeneration. *ASN neuro* 5: e00126.
- Wangsa-Wirawan ND, Linsenmeier RA (2003) Retinal oxygen: Fundamental and clinical aspects. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. 1960)* 121: 547–557.
- Weltgesundheitsorganisation (2015) World report on ageing and health. WHO, Geneva.
- Wu C, Zhao W, Yu J, Li S, Lin L, Chen X (2018) Induction of ferroptosis and mitochondrial dysfunction by oxidative stress in PC12 cells. *Scientific reports* 8: 574.
- Xiang** J, Wan C, Guo R, Guo D (2016) Is Hydrogen Peroxide a Suitable Apoptosis Inducer for All Cell Types? *BioMed research international* 2016: 7343965.
- Yamamoto** C, Ogata N, Yi X, Takahashi K, Miyashiro M, Yamada H, Uyama M, Matsuzaki K (1998) Immunolocalization of transforming growth factor beta during wound repair in rat retina after laser photocoagulation. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 236: 41–46.
- Young RW (1967) The renewal of photoreceptor cell outer segments. *The Journal of cell biology*.
- Zhao** W, Feng H, Sun W, Liu K, Lu J-J, Chen X (2017) Tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) induced apoptosis and necroptosis in endothelial cells: Roles of NOX4 and mitochondrion. *Redox biology* 11: 524–534.
- Zhu X-f, Zou H-d (2012) PEDF in diabetic retinopathy: A protective effect of oxidative stress. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012: 580687.

8 ANHANG

Tabelle 13: Ergebnisse der Stresstitration von Wasserstoffperoxid (H₂O₂), tert-Butylhydroperoxid (TBHP) und Erastin auf Basis von Grundmedium (GM) in Ergänzung zu Abbildung 15. Standardabweichung (STABW), nicht signifikant (n.s.), signifikante Werte für p-Wert <0.05 durch Sternchen * gekennzeichnet

Stressor	Stressor-Konzentration in µM	Zellviabilität in % im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle	STABW	Signifikanz (p<0.05) Students t-Test (beidseitig, ungepaart)
H ₂ O ₂	100	41	23,38	*
	250	11	6,35	*
	500	9	4,42	*
	1.000	5	3,65	*
TBHP	100	44	10,47	*
	250	31	5,89	*
	500	25	6,60	*
	1.000	20	10,69	*
Erastin	1	116	10,78	n.s.
	7,5	108	18,48	n.s.
	15	104	17,28	n.s.
	30	115	15,52	n.s.

Tabelle 14: Ergebnisse der Stresstitration von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) auf Basis von Organkulturmedium (OKM) mit unterschiedlicher Vorinkubation von einer oder 24 Stunden (h) in Ergänzung zu Abbildung 16. Standardabweichung (STABW), nicht signifikant (n.s.), signifikante Werte für p-Wert <0.05 durch Sternchen * gekennzeichnet

	H ₂ O ₂ -Konzentration in µM	Zellviabilität in % im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle	STABW	Signifikanz (p<0.05) Students t-Test (beidseitig, ungepaart)
Vorinkubation mit OKM für 1 h	100	94	4,20	n.s.
	150	94	9,17	n.s.
	200	98	1,89	n.s.
	250	94	4,46	n.s.
	300	91	9,09	n.s.
	300 (2. Messung)	90	1,63	n.s.
	600	83	4,86	n.s.
	900	80	0,83	n.s.
	1.200	72	7,55	*
	1.500	68	4,14	*

Fort- setzung: 1 h	2.000	78	11,31	*
	2.100	80	4,01	*
	2.250	75	3,76	*
	2.400	73	6,09	*
	2.500	73	9,50	*
	3.500	49	5,41	*
Vor- inkuba- tion mit OKM für 24 h	2.000	79	5,31	*
	2.100	79	3,28	*
	2.250	79	3,10	*
	2.400	78	1,10	*
	2.500	79	2,28	*
	3.000	78	3,10	*
	3.500	77	22,74	*

Tabelle 15: Ergebnisse der Stresstitration von tert-Butylhydroperoxid (TBHP) auf Basis von Organkulturmedium (OKM) mit unterschiedlicher Vorinkubation von einer oder 24 Stunden (h) in Ergänzung zu Abbildung 16. Standardabweichung (STABW), nicht signifikant (n.s.), signifikante Werte für p-Wert <0.05 durch Sternchen * gekennzeichnet

	TBHP- Konzentration in µM	Zellviabilität in % im Vergleich zu der unbe- handelten Kontrolle	STABW	Signifikanz (p<0.05) Students t-Test (beidseitig, ungepaart)
Vor- inkuba- tion mit OKM für 1 h	77	105	7,81	n.s.
	192	99	9,50	n.s.
	385	95	14,50	n.s.
	577	92	11,68	n.s.
	769	88	7,55	n.s.
	1.000	89	18,87	n.s.
	1.500	86	15,49	n.s.
	2.000	90	15,39	n.s.
	2.500	86	16,74	n.s.
	3.000	85	15,53	n.s.
	3.000 (2. Messung)	91	8,57	n.s.
	6.000	89	4,84	n.s.
	9.000	83	6,23	*
	12.000	76	6,37	*
	15.000	68	0,83	*
Vor- inkuba- tion mit OKM für 24 h	77	121	10,76	*
	192	118	7,48	*
	385	105	14,48	n.s.
	577	97	5,24	n.s.
	769	97	9,33	n.s.

Tabelle 16: Ergebnisse der Stresstitration von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) bei vorangegangener Kultivierung der SH-SY5Y-Zellen mit Kulturmedium 1 mit einem Anteil an Fetalem Kälberserum (FCS) von 10 % auf der 96-Well-Platte über 96 Stunden, in Ergänzung zu Abbildung 17. Standardabweichung (STABW), nicht signifikant (n.s.)

H ₂ O ₂ -Konzentration in µM	Zellviabilität in % im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle	STABW	Signifikanz (p<0.05) Students t-Test (beidseitig, ungepaart)
2.000	107	7,04	n.s.
2.100	108	9,37	n.s.
2.250	102	9,59	n.s.
2.400	99	11,14	n.s.
2.500	97	9,68	n.s.

Tabelle 17: Ergebnisse der Stresstitration von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) bei vorangegangener Kultivierung der SH-SY5Y-Zellen mit Organkulturmedium mit einem Anteil an Fetalem Kälberserum (FCS) von 10 % auf der 96-Well-Platte über 96 Stunden, in Ergänzung zu Abbildung 17. Standardabweichung (STABW), nicht signifikant (n.s.)

H ₂ O ₂ -Konzentration in µM	Zellviabilität in % im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle	STABW	Signifikanz (p<0.05) Students t-Test (beidseitig, ungepaart)
2.000	94	10,05	n.s.
2.100	93	13,04	n.s.
2.250	91	7,92	n.s.
2.400	81	13,70	n.s.
2.500	83	13,04	n.s.

Tabelle 18: Zellviabilität der SH-SY5Y-Zellen nach Zugabe der apikalen Organkulturüberstände von Tag eins, Inkubation für eine Stunde und Zugabe von oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in Ergänzung zu Abbildung 18. Selektive Retinatherapie (SRT), Thermische Stimulation der Retina (TSR), Standardabweichung (STABW), nicht signifikant (n.s.) nach Students t-Test (beidseitig, ungepaart)

SRT 100 µm, n = 6	Tag 1, 3.500 µM H ₂ O ₂ , 1 h Vorinkubation			
	unbehandelt		gelasert	
	- H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂	- H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂
Zellviabilität in %	100	62,91	107,42	67,09
STABW in %	12,46	9	7,22	10,22
Signifikanz (p<0.05)			n.s.	n.s.

TSR 100 µm, n= 6	Tag 1, 3.500 µM H ₂ O ₂ , 1 h Vorinkubation			
	unbehandelt		gelasert	
	- H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂	- H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂
Mittelwert in %	100	47,24	97,62	53,36
STABW in %	25,52	45,48	23,87	43,83
Signifikanz (p<0.05)			n.s.	n.s.
STR 200 µm, n = 6	Tag 1, 3.500 µM H ₂ O ₂ , 1 h Vorinkubation			
	unbehandelt		Gelasert	
	- H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂	- H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂
Mittelwert in %	100	59,91	100,62	55,72
STABW in %	7,97	6,19	9,79	22,54
Signifikanz (p<0.05)			n.s.	n.s.
TSR 200 µm, n= 6	Tag 1, 3.500 µM H ₂ O ₂ , 1 h Vorinkubation			
	unbehandelt		gelasert	
	- H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂	- H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂
Mittelwert in %	100	66,78	103,03	62,98
STABW in %	10,94	6,84	10,42	8,05
Signifikanz (p<0.05)			n.s.	n.s.

Tabelle 19: Zellviabilität der SH-SY5Y-Zellen nach Zugabe der apikalen Organkulturüberstände von Tag eins, Inkubation für 24 Stunden und Zugabe von oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in Ergänzung zu Abbildung 19. Selektive Retinatherapie (SRT), Thermische Stimulation der Retina (TSR), Standardabweichung (STABW), nicht signifikant (n.s.), signifikante Werte für p-Wert <0.05, Students t-Test (beidseitig, ungepaart), durch Sternchen * gekennzeichnet

SRT 100 µm, n = 6	Tag 1, 3.500 µM H ₂ O ₂ , 24 h Vorinkubation			
	unbehandelt		gelasert	
	- H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂	- H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂
Mittelwert in %	100	82,4	107,51	76,19
STABW in %	13,47	24,17	9,76	2,7
Signifikanz (p<0.05)			n.s.	n.s.
TSR 100 µm, n= 6	Tag 1, 3.500 µM H ₂ O ₂ , 24 h Vorinkubation			
	unbehandelt		gelasert	
	- H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂	- H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂
Mittelwert in %	100	88,59	93,59	82,83
STABW in %	58,56	60,72	56,11	62,23
Signifikanz (p<0.05)			n.s.	n.s.
STR 200 µm, n = 6	Tag 1, 3.500 µM H ₂ O ₂ , 24 h Vorinkubation			
	unbehandelt		gelasert	
	- H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂	- H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂
Mittelwert in %	100	68,76	89,64	52,83
STABW in %	14,71	19,13	28,28	51,49
Signifikanz (p<0.05)			n.s.	n.s.

TSR 200 µm, n= 6	Tag 1, 3.500 µM H ₂ O ₂ , 24 h Vorinkubation			
	unbehandelt		gelasert	
	- H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂	- H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂
Mittelwert in %	100	54,09	99,42	84,15
STABW in %	30,1	41,68	29,68	9,9
Signifikanz (p<0.05)			n.s.	*

Tabelle 20: Zellviabilität der SH-SY5Y-Zellen nach Zugabe der apikalen Organkulturüberstände von Tag drei, Inkubation für 24 Stunden und Zugabe von oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in Ergänzung zu Abbildung 20. Selektive Retinatherapie (SRT), Thermische Stimulation der Retina (TSR), Standardabweichung (STABW), nicht signifikant (n.s.), signifikante Werte im Students t-Test (beidseitig, ungepaart) für p-Wert <0.05 durch Sternchen * gekennzeichnet

SRT 100 µm, n = 6	Tag 3, 3.000 µM H ₂ O ₂ , 24 h Vorinkubation			
	unbehandelt		gelasert	
	- H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂	- H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂
Mittelwert in %	100	64,02	96,88	68,12
STABW in %	6,74	9,01	6,53	8,62
Signifikanz (p<0.05)	-		n.s.	n.s.
TSR 100 µm, n= 6	Tag 3, 3.000 µM H ₂ O ₂ , 24 h Vorinkubation			
	unbehandelt		gelasert	
	- H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂	- H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂
Mittelwert in %	100	61,37	104,99	84,71
STABW in %	23,94	42,83	23,02	23,15
Signifikanz (p<0.05)			n.s.	n.s.
STR 200 µm, n = 6	Tag 3, 3.000 µM H ₂ O ₂ , 24 h Vorinkubation			
	unbehandelt		gelasert	
	- H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂	- H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂
Mittelwert in %	100	64,27	102,12	59,19
STABW in %	9,48	5,22	7,48	27,76
Signifikanz (p<0.05)			n.s.	n.s.
TSR 200 µm, n= 6	Tag 3, 3.000 µM H ₂ O ₂ , 24 h Vorinkubation			
	unbehandelt		gelasert	
	- H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂	- H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂
Mittelwert in %	100	48,68	99,82	75,31
STABW in %	9,38	14,37	6,98	4,95
Signifikanz (p<0.05)			n.s.	*

9 DANKSAGUNG

Hier möchte ich allen Personen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben:

Zunächst gilt mein Dank dem Direktor der Klinik für Ophthalmologie am UKSH Kiel, **Prof. Dr. Johann Roider**, für die Bereitstellung der Räumlichkeiten in seiner Klinik und die Unterstützung meines Forschungsprojekts.

Sehr herzlich danken möchte ich **Prof. Dr. Alexa Klettner**, die mir als meine Doktormutter mit ihrer fachlichen Expertise stets zur Seite stand und mich insbesondere während des Schreibprozesses begleitet und mir mit zahlreichen Ratschlägen geholfen hat.

Weiterhin danke ich der **Arbeitsgruppe Young DOG der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG)** für die Förderung meiner Arbeit über ein Doktorandenstipendium im Jahre 2018.

Meiner Betreuerin **Dr. Elisabeth Richert** danke ich sehr für das faszinierende Thema, die Beantwortung all meiner Fragen zu der Arbeit am Laser, ihre Unterstützung bei der Bewerbung auf das Doktorandenstipendium, ihre stets positive Art und ihre zahlreichen Tipps, auch während ihrer Elternzeit.

Bei meinem Betreuer **Dr. Jan Tode** möchte ich mich ebenfalls für das faszinierende Thema, die weisen Ratschläge für alle Lebenslagen und die zahlreichen Geschichten aus seiner eigenen Doktorandenzeit bedanken. Die beiden haben mir durch ihre herzliche und motivierende Art sehr bei der Realisation dieses Promotionsprojektes geholfen und mir das spannende Kongressleben gezeigt.

M. Sc. Philip Dörschmann danke ich für sein offenes Ohr bei Fragen im Labor und für seine fachliche Expertise, die bei der Realisierung der SHSY-Versuche eine große Hilfe war. Dem Laborteam bestehend aus **Serap Luick, Kathinka Winter, Mandy Götz** und **Monika Marquardt** danke ich für die freundliche Aufnahme und die kompetente Einarbeitung im Labor. Weiter haben sie durch viele hilfreiche Tipps, gute Pausengespräche und die ausgezeichnete Versorgung mit Nervennahrung zu dieser Arbeit beigetragen.

Luisa Dietrich möchte ich für die vielen gemeinsamen Wochenenden in der Zellkultur und die gute Freundschaft, die aus der gemeinsamen Laborzeit entstanden ist, danken. Vielen Dank auch für den gemeinsamen Kongressbesuch und dein Organisationstalent für sichere Heimreisen.

Meinen Freunden danke ich für stundenlange Gespräche über Schweineaugen und neuronale Zellen, die einfach nicht sterben wollten. Ihr wart eine große moralische Unterstützung und seid immer für mich da. Insbesondere gilt mein Dank meiner Uni-Crew für ihre Hilfe beim Spagat zwischen Vorlesungen und Labor, Nicole für die Unterstützung beim Korrekturlesen und meinen beiden Lauras für die Kaffeepausen-Gesellschaft während der Schreibphase.

Zu guter Letzt danke ich **meinem Bruder Lennart** und **meinen Eltern Martina und Andreas Papenkort** für ihre bedingungslose Unterstützung und den unerschütterlichen Glauben an mich. Ohne ihren Rückhalt wären mein Studium und meine Promotion nicht möglich gewesen.

10 VERÖFFENTLICHUNGEN

TAGUNGSBEITRAG – VORTRAG

Papenkort J, Richert E, Tode J, Klettner A, Roeder J; (2019) Einfluss schonender Lasertherapien (SRT und TSR) auf die Sekretion von Zellmediatoren zur Untersuchung einer neuroprotektiven Wirkung
Retina – from Bench to Bedside
117. Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, Berlin, 2019

PUBLIKATION AUS DER VORLIEGENDEN ARBEIT

Papenkort J, Richert E, Volkmann I, Hösel K, Dörschmann P, Roeder J, Klettner A, Tode J, (2021) Neuroprotective Effects of Thermal Stimulation of the Retina and Selective Retina Therapy Implications for the Treatment of Macular Disease
JSM Ophthalmology, ISSN: 2333-6447

Richert E, **Papenkort J**, von der Burchard C, Klettner A, Arnold P, Lucius R, Brinkmann R, Framme C, Roeder J, Tode J, (2021) Selective retina therapy and thermal stimulation of the retina: different regenerative properties - implications for AMD therapy
BMC Ophthalmology, DOI: 10.1186/s12886-021-02188-8

Richert E, **Papenkort J**, Klettner A, Tode J, Koinzer S, Brinkmann R, Fink C, Roeder T, Lucius R, Roeder J; (2020) Response of Retinal Pigment Epithelium (RPE)-Choroid Explants to Thermal Stimulation Therapy of the RPE (TSR)
Lasers in surgery and medicine, DOI: 10.1002/lsm.23288

11 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich, Julia Katharina Papenkort, versichere hiermit an Eides Statt, dass meine Dissertation, abgesehen von Ratschlägen meiner Betreuer*innen und meiner sonstigen akademischen Lehrer*innen, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich keine anderen als die in der Arbeit aufgeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und dass meine Arbeit bisher keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat, weder ganz noch in Teilen. Ich versichere, dass ich bisher keinen erfolglosen Promotionsversuch unternommen habe.

21.12.2021

