

Aus der Augenklinik mit Poliklinik  
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg  
Vorstand: Prof. Dr. Kruse  
Angefertigt unter der Leitung von  
PD Dr. Schlötzer-Schrehardt

vorgelegt über das  
Institut für Tierpathologie  
der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Lehrstuhl für allgemeine Pathologie und Neuropathologie  
Vorstand: Prof. Dr. Schmahl

**Retinale und chorioidale Veränderungen bei  
LDL-Rezeptor-knockout Mäusen als Modell für die  
altersabhängige Makuladegeneration**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Nikola-Simone Franz-Haas  
aus Erlangen

Erlangen 2005

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. W. Breuer

Korreferent: Prof. Dr. C. Knospe

Tag der Promotion: 11.Februar 2005

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	4
1.1. Klinische Bedeutung der AMD.....	4
1.2. Klinische Diagnose.....	5
1.3. Ätiologie.....	5
1.4. Histopathologie.....	6
1.5. Pathogenese.....	7
1.6. Therapie.....	9
2. Zielsetzung.....	10
3. Material und Methoden.....	10
3.1. Versuchstiere.....	10
3.2. Transmissionselektronenmikroskopie.....	12
3.3. Histochemische Untersuchung.....	13
4. Ergebnisse.....	13
4.1. Elektronenmikroskopie.....	13
4.1.1. Choriokapillaris .....	14
4.1.2. Bruchsche Membran.....	14
4.1.3. Retinales Pigmentepithel.....	16
4.1.4. Sensorische Netzhaut.....	17
4.2. Ölrot-O Färbung.....	18
5. Diskussion.....	20
5.1. Beurteilung der Ergebnisse.....	20
5.2. Vergleich mit der Histopathologie der AMD.....	21
5.3. Vergleich mit den Ergebnissen anderer Arbeiten.....	21
5.4. Tiermodelle und AMD.....	22
5.5. Versuche mit der LDL-Rezeptor-knockout Maus.....	23
5.6. AMD-Risikofaktor: Arteriosklerose.....	24
5.7. AMD-Risikofaktor: fettreiche Ernährung und erhöhter Body Mass Index.....	25
5.8. Eignung als Tiermodell.....	26
6. Zusammenfassung.....	28
7. Summary.....	29
8. Abkürzungen.....	30
9. Literaturverzeichnis.....	31
10. Danksagung .....	37

## 1. Einleitung

### 1.1. Klinische Bedeutung der AMD

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist in den westlichen Ländern die häufigste Ursache für den Verlust des zentralen Sehvermögens bei Menschen über dem fünfzigsten Lebensjahr (CAMPOCHIARO 1999). Dabei kommt es zum progressiven Funktionsverlust der Stelle des schärfsten Sehens, dem gelben Fleck, der Macula lutea.

Klinisch sind die Frühformen dieser Erkrankung kaum von altersphysiologischen Veränderungen zu unterscheiden, oft ist hier der Übergang des Gesunden zum Kranken fließend (NAUMANN 2000). Zwei unterschiedliche Formen können dem Krankheitskomplex der AMD zugeordnet werden: man unterscheidet nach NAUMANN (2000) die trockene Form der AMD, die mit Drusen einhergeht, irregulären Pigmentierungen und der geographischen Atrophie des retinalen Pigmentepithels (RPE), und die feuchte oder exsudative Form der AMD, bei der zusätzlich chorioidale Neovaskularisationen auftreten.

Für die betroffenen Patienten hat die Erkrankung eine erhebliche Einschränkung der gewohnten Lebensqualität zur Folge. Vom Fortschreiten der AMD abhängig, kann es dem Betroffenen unmöglich werden, zu lesen, zu schreiben, oder andere Tätigkeiten auszuführen, bei denen dem zentralen Sehen ein besonderer Stellenwert zukommt.

Die AMD kann in ihrem Krankheitsverlauf auch zu einer Erblindung im Sinne des Gesetzes führen.

Unter Erblindung im Sinne des Blindengeldgesetzes versteht man eine verbleibende Sehkraft von 1/50 und darunter im besseren Auge, oder ausgedehnte Gesichtsfelddefekte, die zu einem hochgradigen Verlust des Sehvermögens führen, sodass eine unabhängige Lebensführung nicht mehr möglich ist (PRO RETINA 2000).

Je nach Literaturstelle und Ort der Untersuchung sind zwischen 2,1% und 100 % der älteren Bevölkerung über 65 Jahren an der AMD erkrankt, wie eine Übersicht der Prävalenzstudien durch HOLZ et al. (2003) zeigt: So waren nach VINGERLING et al. (1995) unter den Menschen in Rotterdam im Alter von 65 bis 74 Jahren 9,9% und im Alter über 85 Jahren 29,8% an einer Form der AMD erkrankt. In Finnland dagegen waren nach HIRVELA et al. (1996) 25% der Menschen im Alter von 70 bis 74 Jahren und 83% der 85- bis 89- jährigen Personen, sowie 100% der Menschen jenseits des 90. Lebensjahres von dieser Erkrankung betroffen. In der Beaver Dam Studie (KLEIN et al. 2003) wurden im Altersabschnitt 65. bis 74. Lebensjahr nach HOLZ et al. (2003) 25,3% und jenseits des 85. Lebensjahres 48,7% Erkrankte ermittelt.

Ungeachtet dieser erheblichen Unterschiede der einzelnen Zahlen, wird die AMD in Anbetracht der demographischen Bevölkerungsentwicklung in den nächsten Jahren wohl noch weiter an Bedeutung zunehmen (CAMPOCHIARO 1999).

Bisher konnten aber weder die Ätiologie, noch die Pathogenese oder Möglichkeiten einer Prävention eindeutig geklärt werden.

## 1.2. Klinische Diagnose

In der Praxis gehört der Amsler-Gitter-Test (PRO RETINA 2003) zur Routinekontrolle beim Augenarzt, ebenso stellt er eine Möglichkeit der Eigenkontrolle dar. Es handelt sich dabei um ein Feld mit ebenmäßiger, kariierter Linierung, ähnlich einem Blatt karierten Papiers (Rechenblatt). Werden bei einäugiger Fokussierung Unregelmäßigkeiten der Linien, oder zu wenige Quadrate gesehen, muss umgehend eine gründliche augenärztliche Untersuchung eingeleitet werden.

Diagnostisches Merkmal für das Vorliegen einer Frühform der AMD ist besonders das Vorhandensein von extrazellulären Ablagerungen zwischen retinalem Pigmentepithel und Chorioidea (MULLINS et al. 2000), so genannten Drusen, und pathologischen Veränderungen des retinalen Pigmentepithels (NAUMANN 2000). Nach NAUMANN (2000) werden zwei Arten von Drusen unterschieden: große, weiche, meist konfluierende Drusen, die vorwiegend aus Neutralfetten bestehen und kleine, harte, mit Fluorescein anfärbbare Drusen, die vor allem polare hydrophile Phospholipide enthalten. Große Drusen prädisponieren zur Abhebung des retinalen Pigmentepithels, kleine dagegen zur chorioidalen Neovaskularisation. Eine spezielle Drusenform stellen basale laminare (kutikuläre) Drusen dar, die eine noduläre Verdickung der Basalmembran des RPE repräsentieren (HOLZ et al. 2003). Zu den Frühstadien der AMD zählen auch Pigmentanomalien des RPE, besonders in Form von Hyper- und Hypopigmentationen, der geographischen Atrophie des RPE (NAUMANN 2000).

Zur Darstellung dieser retinalen Veränderungen eignet sich die ophthalmoskopische Untersuchung (Funduskopie) oder weiterführende Spezialuntersuchungen, wie z.B. die Fluoreszenzangiographie.

## 1.3. Ätiologie

Die AMD ist eine der komplexesten Augenerkrankungen, an deren Ätiologie eine ganze Reihe von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen beteiligt ist.

- Genetische Faktoren

Die AMD scheint nach MULLINS et al. (2000) autosomal dominant vererbt zu werden. Auch nach DITHMAR et al. (2000) korreliert das Auftreten der AMD mit einem veränderten Apolipoprotein E Allel der Erkrankten.

- Risikofaktoren

Hohes Lebensalter und Zigarettenrauchen scheinen in der Literatur allgemein (MICELLI et al. 2000, NAUMANN 2000, CURCIO et al. 2001, SMITH et al. 2001) als Risikofaktoren anerkannt, diskutiert werden aber auch:

- hohe Lichtexposition (MICELLI et al. 2000), oxidative Schädigungen und helle Haut- und Irisfarbe (CIULLA 2001)

- kardiovaskuläre Erkrankungen (VINGERLING et al. 1995; AREDS 2000, HYMAN et al. 2000, MICELLI et al. 2000), wie Bluthochdruck (AREDS 2000, KLEIN et al. 2003)
- Ernährung (MICELLI et al. 2000), erhöhter Cholesterinspiegel (AREDS 2000, FRIEDMAN 2000), erhöhter Body Mass Index (HIRVELA et al. 1996, AREDS 2000, SEDDON et al. 2003)
- erhöhter Serumspiegel an vascular endothelial growth factor (LIP et al. 2001)
- weibliches Geschlecht (AREDS 2000) oder mangelhafte Östrogensubstitution nach der Menopause (FRIEDMAN 2000).

Ferner vertreten einige Autoren die Ansicht, zur Netzhautdegeneration kommt es aufgrund von Mangelernährung (NEUHARDT et al. 1999, AREDS 2000). Hierbei könnte der Mangel an bestimmten Antioxidantien und Nährstoffen von besonderer Bedeutung sein (siehe Kap.1.6.).

Die AMD hat somit den Charakter einer multifaktoriellen Erkrankung, die durch das Zusammenwirken von einzelnen unterschiedlich pathogenen Einflüssen bedingt wird.

#### 1.4. Histopathologie

Veränderungen der Bruchschens Membran und des basalen RPE's gehören zu den auffälligsten histopathologischen Kriterien der AMD, auch wenn die genauen Mechanismen ihrer Entstehung noch wenig geklärt sind.

Man beobachtet bei der AMD eine Ansammlung von extrazellulären Ablagerungen des RPE zwischen der basalen Zellmembran der Pigmentepithelzellen und ihrer Basalmembran (NAUMANN 2000). Sie werden unterteilt in "basal laminar deposits" (BLamD): elektronendichtes körniges Material zwischen Plasma- und Basalmembran des RPE's und „basal linear deposits“ (BLinD): membranöser Debris und nicht membrangebundene elektronentransparente Vesikel, meist zwischen der Basalmembran des RPE's und der inneren Kollagenschicht der Bruchschens Membran, wobei nur diese Ablagerungen für die AMD spezifisch sind (DITHMAR et al. 2000).

GREEN (1999) beschreibt die Histopathologie der AMD wie folgt:

Erste Anzeichen einer AMD sind basale Ablagerungen außerhalb des retinalen Pigmentepithels (BLinD und BLamD). Sekundäre Veränderungen des RPE äußern sich dann weiterhin in einer Abnahme des Pigmentgehaltes, Hypertrophie, Hyperplasie und Atrophie der Pigmentepithelzellen. So genannte „weiche Drusen“ in Form von hyalinen Ablagerungen zwischen RPE und Bruchscher Membran und chorioidale Neovaskularisationen folgen. Durch Rupturen der Bruchschens Membran können Neovaskularisationen der Choriokapillaris noch beschleunigt werden, es kommt nachfolgend zur Ausbreitung der neu gebildeten Kapillaren, durch die defekte Bruchsche Membran, unterhalb des RPE, die dann zu Venen oder Arterien ausgebildet werden. Nur ein kleiner Prozentsatz der Gefäße gelangt in den subretinalen Raum und richtet dort durch Exsudate, RPE- und Netzhautabhebungen oder Hämorrhagien erheblichen Schaden an.

Abb.1 erläutert die physiologischen Aufgaben der betroffenen Strukturen:

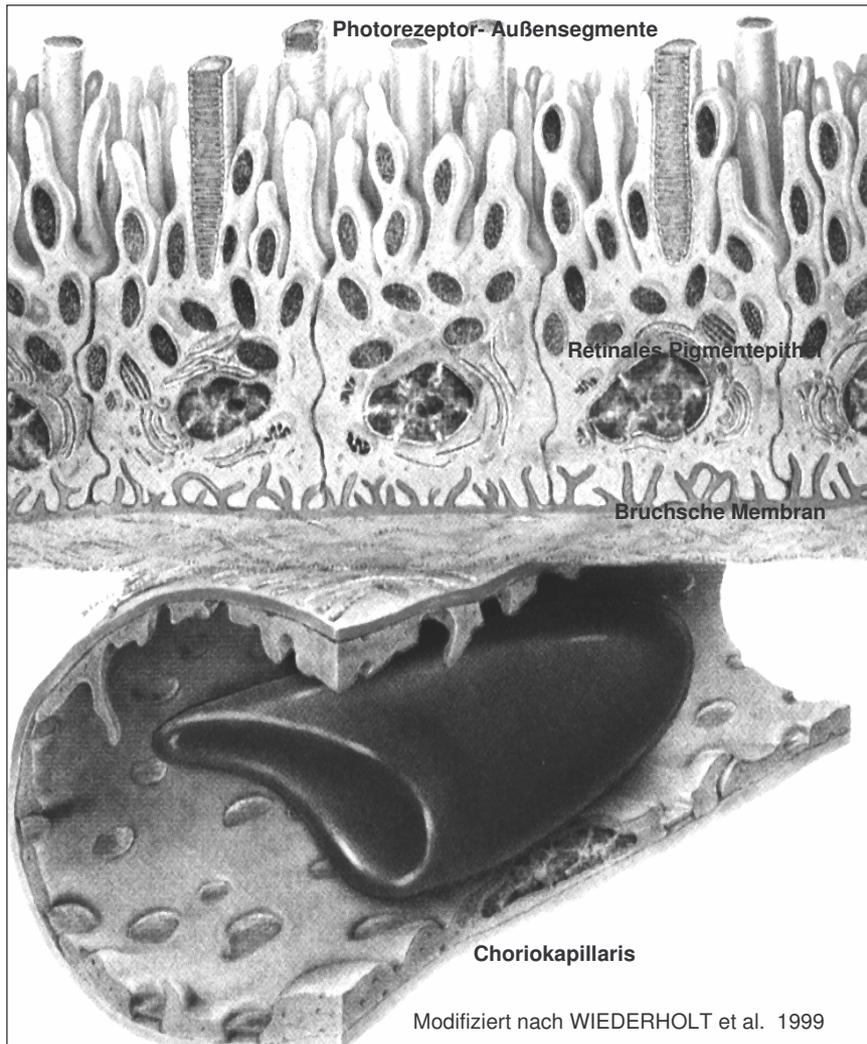


Abb.1: Physiologie des RPE, der Bruchschsche Membran und der Choriokapillaris (nach NAUMANN 2000): Durch das gefensterete Endothel der Kapillaren der Choriokapillaris können Sauerstoff und Nährsubstrate von der Blutbahn in das umgebende Gewebe gelangen. Diese diffundieren durch die Schichten der Bruchschsche Membran und gelangen so in die Pigmentepithelzellen und Photorezeptoren. Die Netzhautarterien versorgen nur die zwei inneren Drittel der Netzhaut, Photorezeptoren und das RPE sind auf den Diffusionsweg angewiesen. An die Bruchschsche Membran grenzt das basale Labyrinth: Einstülpungen der Plasmamembran zur Oberflächenvergrößerung der RPE-Zellen. In der Zellmitte und im apikalem Zellbereich finden sich die Zellorganellen, der Zellkern und die namensgebenden Pigmentgranula. Apikal reicht ein Mikrovillisaum in die Photorezeptorenschicht. Die Bestandteile der Photorezeptor-Außensegmente werden ständig erneuert. Die Stäbchen bestehen aus feinen geldrollenartigen Membranscheibchen, die das Sehpigment Rhodopsin enthalten. Beim Sehvorgang wandelt sich das 11-cis Retinal in die all-trans Form um und kann erst im RPE wieder in die aktive Form umgewandelt werden. Für diese Stoffwechselleistung ist die RPE-Zelle mit einer Vielzahl an Zellorganellen ausgestattet, wie Polyribosomen, Golgi-Apparate, endoplasmatisches Retikulum und Phagosomen.

### 1.5. Pathogenese:

Die genauen pathophysiologischen Mechanismen der Entstehung einer AMD sind unklar, dies bezeugen die vielen verschiedenen Theorien zur Pathogenese (LUTTY 1999):

- Das Modell des eskalierten Alterungsprozesses

Nach NAUMANN (2000) akkumuliert das retinale Pigmentepithel physiologischer Weise im Alter unverdaute Stoffwechselendprodukte der phagozytierten Außensegmente der Photorezeptoren in Form von Lipofuszin. Dieser Prozess kann sich durch oxidative oder lichttoxische Schädigungen noch beschleunigen. Die Zellen des RPE wiederum lagern das unverdauliche Material in der Bruchschsche Membran ab, die sich somit diffus verdickt und eine erhöhte Menge an Lipiden aufweist. In diesem Stadium wird der Nährstofftransport zum RPE über die Bruchschsche Membran beeinträchtigt. Durch zunehmende metabolische Insuffizienz und Apoptosevorgänge der Pigmentepithelzellen sowie durch eine abnehmende Diffusionskapazität der Bruchschsche Membran (STARITA et al. 1996) eskalieren diese beschleunigten Alterungsprozesse und münden in der

visusbeeinträchtigenden Erkrankung einer AMD. Der Übergang der physiologischen Alterungsprozesse zum pathologischen Stadium einer AMD kann von den genannten Kofaktoren (siehe Kap. 1.3.) beeinflusst werden. Da sich an der Macula lutea die höchste Photorezeptordichte findet, ist dort eine besonders intensive Stoffwechsellleistung die Folge, auch lichttoxische Effekte wirken hier am stärksten, was das bevorzugte Auftreten der Veränderungen an dieser Stelle erklärt.

Nach diesem Modell ist die Degeneration der Choriokapillaris eine sekundäre Folge der Pigmentepitheldegeneration und nicht die Ursache der AMD.

- Immunologisches Modell

Drusen entstehen in diesem Modell, als sekundäre Manifestation einer Autoimmunreaktion, die gegen Zellantigene des retinalen Pigmentepithels gerichtet ist (SCHLÖTZER-SCHREHARDT 2000). Das Krankheitsgeschehen wird durch die Immunreaktion gegen eine beschädigte RPE-Zelle initiiert. Zellfortsätze dendritischer Zellen aus der Chorioidea wachsen durch die Bruchsche Membran zur abnormen RPE-Zelle, sezernieren dort immunmodulatorische Komponenten und Komplementfaktoren. Um diesen dendritischen Kern reifen die Drusen. Physiologische Hinweise für diese Hypothese liefern die in den Drusen enthaltenen Substanzen (Komplementfaktoren und immunmodulatorische Komponenten), nachgewiesene Autoantikörper gegen RPE im Serum und Endfortsätze dendritischer Zellen aus der Aderhaut im Zentrum der Drusen, so genannte Drusenkerne.

- Arteriosklerose-Modell

Dieses Modell basiert auf der Beobachtung, dass die Zusammensetzung der Drusen der Zusammensetzung der perivaskulären Ablagerungen bei Arteriosklerose sehr ähnlich ist (MULLINS et al. 2000). Unterstützt wird diese Theorie auch durch die ultrastrukturellen Ähnlichkeiten (DITHMAR et al. 2001) zwischen den extrazellulären Ablagerungen bei Arteriosklerose und dem Material der „basal linear deposits“ (siehe Kap.1.4.). Auch CURCIO et al. (2001) schlagen gemeinsame pathogenetische Mechanismen für AMD und atherosklerotische, kardiovaskuläre Erkrankungen vor, da sie große Übereinstimmungen dieser beiden Erkrankungen auf der Ebene der Gewebe, Zellen und Moleküle nachwiesen.

Nach FRIEDMAN (2000) kommt es ursprünglich zur Exsudation von Serumlipiden aus chorioidalen Gefäßen und deren Ablagerung in Sklera und Bruchscher Membran. Die in der Bruchschen Membran eingelagerten Serumlipide werden dann nachfolgend zu basalen Ablagerungen und Drusen umgebaut und die Bruchsche Membran verkalkt und wird brüchig. Durch feine Risse in der Bruchschen Membran können dann Neovaskularisationen der chorioidalen Kapillaren entstehen. Die Vorgänge an der alternden Bruchschen Membran vergleicht der Autor mit den Veränderungen in

Gefäßwänden großer und mittlerer Arterien. FRIEDMAN (2000) betont, die Veränderungen des RPE seien Folgen des vaskulären Krankheitsgeschehens, nicht aber deren Ursache.

Auch nach CIULLA (2001) handelt es sich primär um Gefäßveränderungen in der Chorioidea, die dann sekundär eine Dysfunktion des retinalen Pigmentepithels verursachen. Arteriosklerotische Veränderungen der choriokapillären Gefäße führen zu Lipideinlagerungen in die Bruchsche Membran. Die Membran verliert an Elastizität und wird dicker, so dass eine Diffusionsbarriere entsteht. Strukturschädigungen der Bruchschens Membran und nachfolgend auch chorioidale Neovaskularisationen können so leichter entstehen.

Durch weitere Studien konnte die Hypothese, arteriosklerotische Gefäßveränderungen korrelierten mit der AMD, gestützt werden: In der Rotterdam-Studie wurde beispielsweise 1995 durch VINGERLING et al. eine Abhängigkeit zwischen dem Auftreten arteriosklerotischer Veränderungen der Arteria Carotis communis und dem Auftreten einer fortgeschrittenen AMD nachgewiesen (siehe Kap.5.6.).

## 1.6. Therapie

Obwohl in den vergangenen Jahren zahlreiche neue Therapieansätze entwickelt wurden, steht der Durchbruch noch aus. Rehabilitierende Maßnahmen stehen für die meisten Patienten daher immer noch im Vordergrund.

Etablierte Therapieansätze bestehen in der photodynamischen Therapie (PDT) und der thermischen Lasertherapie (PRO RETINA 2000).

Chirurgische Methoden, wie die Makula- Translokation oder Netzhautrotation, befinden sich noch in der klinischen Prüfung (PRO RETINA 2000). Retina- Transplantate oder Implantate stehen noch nicht zur Verfügung, die Regeneration von retinalen Pigmentepithelzellen in Zellkulturen ist möglich, die Transplantation dieser Zellen befindet sich aber noch im tierexperimentellen Stadium (THOMPSON 2002). Ebenso werden Angiogenese- Inhibitoren und in der transpupillaren Thermotheapie (TTT) in klinischen Studien als Therapie-Option für die exsudative AMD überprüft (PRO RETINA 2003). Rheophorese ist ein Therapieansatz, der die Ablagerungen von Lipiden und Proteinen im retinalen Gewebe durch ein Blutfiltersystem vermindern soll. Das Verfahren ist zugelassen, Wirksamkeitsnachweis und Langzeitergebnisse stehen noch aus (THOMPSON 2002). KONDROT (2000) beschreibt die Möglichkeit, mittels „microcurrent stimulation“ (MCS), die visuellen Fähigkeiten AMD-Erkrankter zu verbessern.

Generell wird dem AMD-Patienten, unabhängig an welcher Form der AMD er erkrankt ist, eine gesunde, vitaminreiche Ernährung empfohlen. Im Rahmen der großen multizentrischen ARED-Studie (2000) konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte Zufuhr an Zink und Antioxidantien das Fortschreiten des Visusverlustes und der klinischen Symptome der AMD, mit einigen Einschränkungen, verlangsamen kann. Ganz allgemein soll die vermehrte

Einnahme von Karotinoiden und Xanthophyllen die visuellen Fähigkeiten verbessern. Besondere Bedeutung könnte dabei dem Lutein zukommen (LIP et al. 2001). Nach ULLRICH (2003) könnten AMD-gefährdete Personen ihr Erkrankungsrisiko mindern, wenn sie hoch dosiertes Vitamin C, Vitamin E, Beta-Karotine in Kombination mit Zink einnehmen.

## 2. Zielsetzung

Für die unzureichende Klärung der Ätiologie und der Pathogenese dieser häufigen Erkrankung wird oft das Fehlen eines adäquaten Tiermodells verantwortlich gemacht (MAJJI et al. 2000, MICELLI et al. 2000). Die wenigen existierenden Tiermodelle spiegeln auch stets nur spezifische Teilaspekte des Krankheitsgeschehens wieder. Im Rahmen der in Frage kommenden Tiermodelle weisen nur Primaten eine differenzierte Makula auf (MICELLI et al. 2000). Es ist jedoch bekannt, dass sich die Veränderungen nicht auf die Makula alleine beschränken, sondern dass auch andere Bereiche der Retina AMD-typische Veränderungen aufweisen (MICELLI et al. 2000).

LDL- Rezeptor-knockout Mäuse stellen ein etabliertes Tiermodell für Hypercholesterinämie und arteriosklerotische Gefäßveränderungen dar (MORI et al. 1999, SEHAYEK et al. 2001). Es kann daher vermutet werden, dass diese Tiere auch arteriosklerotische Veränderungen der chorioidalen Gefäße und Veränderungen der Bruchschens Membran zeigen und damit ein potentielles Modell für die AMD darstellen.

Folgende Fragestellungen liegen der vorliegenden Arbeit zugrunde:

- 1) Zeigt die LDL-Rezeptor-knockout Maus AMD-typische retinale Veränderungen, die sie als AMD-Tiermodell etablieren?
- 2) Welchen zusätzlichen Einfluss haben die Hypercholesterinämie, bzw. Ernährung und das Alter der Tiere auf diese Veränderungen?

Zur Klärung dieser Fragen wurde der Retina-Aderhaut-Komplex der LDL-Rezeptor-knockout Mäuse, sowie der entsprechender Kontrollgruppen des Bl/6J- Stammes verschiedener Altersgruppen und Ernährungsbedingungen, licht- und elektronenmikroskopisch untersucht.

## 3. Material und Methoden:

### 3.1. Versuchstiere:

Wir bezogen die Augen der Versuchstiere aus der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Lübeck von Dr. Z. Aherrahou. Dort wurden die genetischen Mechanismen der Initiierung und der Ausbildung von Arteriosklerose unter dem Einfluss des Fettgehaltes der Nahrung an diesen Mäusen untersucht. Die LDL-Rezeptor-knockout

Mutanten des Bl/6J-Mausstammes und die Bl/6J-Wildtyp-Mäuse stammten aus den Jackson Laboratories (San Diego, USA).

Die Mäuse wurden unter den Bedingungen des „ARVO-Statement for use of animals in ophthalmologic and vision research“ bei gleich bleibenden Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsbedingungen gehalten. Die Beleuchtung erfolgte über einen 12 Stunden Tag-Nacht-Zyklus.

Bl/6J-LDL-Rezeptor-knockout Mäuse und Wildtyp-Mäuse des Bl/6J- Stammes wurden in zwei Altersgruppen aufgeteilt: Junge Mäuse bis zur zwölften Lebenswoche und adulte Mäuse vom vierten bis siebten Lebensmonat. Die Mäuse wurden bis zur zwölften Lebenswoche einheitlich mit Nagerfutter (Altromin 1324-pellet, Lage, Deutschland) aus 19% Rohprotein, 4% Rohfett, 6% Rohfaser, 7% Rohasche (0,9% Calcium, 0,7% Phosphor), 13,5% Feuchtigkeit) ad libidum gefüttert (Chow-Diät) und hatten freien Zugang zum Trinkwasser.

Die Gruppe der adulten Mäuse wurde weiter nach der Fütterung unterteilt: Ab der zwölften Lebenswoche wurde der Chow- Gruppe weiterhin das gleiche Nagerfutter zugeteilt, die High-Fat- Gruppe erhielt stattdessen eine cholesterinreiche Diät („western style“, TD 90221, Teklad Research Diets, Madison, WI), bei der 30% der Gesamtenergie aus Lipiden stammt.

In der vorliegenden Arbeit wurden 33 Mäuseaugen untersucht, die Einteilung in die verschiedenen Gruppen erläutert Tab.1.:

Gruppe	1	2	3	4	5	6
Mäuse	Bl6, jung	Bl6, alt, chow	Bl6, alt, HF	LDL-/-, jung	LDL-/-, alt, chow	LDL-/-, alt, HF
Anzahl Augen	n=3	n=7	n=7	n=5	n=6	n=5

Tab.1: Gruppenzuordnung der Mäuse

Die von Aherrahrou et. al. (Universität Lübeck, Deutschland) ermittelten Serumcholesterinspiegel (zusammengefasst in Tab.2) aus retroorbitalen Blutproben, kontrollierten die ausreichende Aufnahme der zugeordneten Diät.

Gruppe	2	3	5	6
Serumcholesterin	89,9 ± 37,5mg/ml	150 ± 49,9mg/ml	189,0 ± 57,3mg/ml	498,3 ± 121,4mg/ml

Tab.2: Serumcholesterinspiegel der adulten Mäuse

Die Mäuse wurden nach Anästhesie mit Isofluraninhalation, für die Untersuchungen der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Lübeck durch zervikale Dislokation getötet. Die Augen wurden enukleiert und sofort in Glutaraldehyd fixiert und an die Augenklinik Erlangen verschickt.

### 3.2. Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung:

Die Fixierung der Mäuseaugen erfolgte in 2,5% Glutaraldehyd in 0,15M Phosphatpuffer (Sörensen; pH 7,2) bei 4°C für zwei Tage. Nach der Teilung der Augen in zwei Hälften folgte die Nachfixierung in 2% gepuffertem Osmiumtetroxid für 1 Stunde bei 4°C. Nach Entwässerung in aufsteigender Ethanolreihe wurde das Gewebe über Propylenoxid als Intermedium in Epoxydharz (Epon 812) eingebettet. 50-70 nm dicke Ultradünnschnitte wurden mit einem Ultramikrotom (Ultracut: Cambridge Instruments) angefertigt, mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert und mit einem Transmissionselektronenmikroskop (906 E, LEO, Oberkochen) ausgewertet. 1µm dicke, mit 1% Toluidinblau in 1% Borax angefärbte Semidünnschnitte dienten zur Orientierung und lichtmikroskopischen Kontrolle.

Die Analyse erfolgte für jedes Auge in fünf verschiedenen Schnittebenen.

Die gewonnenen Befunde wurden nach retinalen Strukturen gegliedert und der zentralen oder peripheren Netzhaut zugeordnet, in ein Untersuchungsprotokoll eingetragen.

Für die Untersuchung der Choriokapillaris wurde das durchschnittliche Lumen der Kapillaren ermittelt, die Endothelbeschaffenheit und die endotheliale Basalmembran beurteilt.

Die Bruchsche Membran wurde in ihrer Schichtdicke, Struktur und nach Vorhandensein von abnormalen Bestandteilen und deren Lokalisation beurteilt.

Höhe der Zellen, Morphologie und zytoplasmatische Komponenten waren die Beurteilungskriterien im retinalen Pigmentepithel.

Die Untersuchung der sensorischen Netzhaut hatte ihren Schwerpunkt in der Strukturanalyse der Außensegmente der Photorezeptoren.

Maus-Nr:	Gr:	Schnitt: zent/peri	Schnitt: zent/peri	Schnitt: zent/peri	Schnitt: zent/peri	Schnitt: zent/peri
CK Struktur						
5 Messwerte Gefäße						
BM Struktur						
BM vakuol. Einschlüsse						
5 BM Messwerte						
RPE Basales Labyrinth						
RPE Zytoplasma						
RPE apikale Oberfläche						
5 RPE Messwerte						
PR Außensegmente						
PR Innensegmente						

Untersuchungsprotokoll für die elektronenmikroskopische Beurteilung, Größe modifiziert

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden in ein semiquantitatives Beurteilungsschema (siehe Tab.3) übersetzt, Zahlen in Klammern weisen auf den Anteil der Mäuse jeder Gruppe hin, die entsprechende Veränderungen zeigten.

Verwendetes Zeichen	-	±	+	++	+++
Anteil der betroffenen Mäuse je Gruppe	0%	≤25%	≤50%	≤75%	≤100%

Tab.3: Legende des semiquantitativen Beurteilungsschemas

Zur quantitativen Analyse bestimmter Strukturen wurde ein Zwei-Punkte Messverfahren mittels EM-integrierter Software angewandt, an fünf verschiedenen Stellen des Gewebeschnittes die Messung durchgeführt und daraus über die Software „Microsoft Excel“ die Mittelwerte pro Auge und pro Gruppe, sowie die Standardabweichungen errechnet.

### 3.3. Histochemische Untersuchung

Für den histologischen Nachweis von Lipidablagerungen im Bereich der Chorioidea und Retina der Mäuseaugen verwendeten wir die Ölrot O-Färbung (BÖCK 1998). Die Färbung stellt alle Lipide dar, die sich intensiv rot anfärben.

Drei Augen je Gruppe wurden in Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek, USA) eingebettet und in flüssigem Stickstoff kryofixiert. Mit einem Kryostat CM 3050 (Leica, Bensheim) wurden 7µm dicke Gefrierschnitte angefertigt, auf Gelatine-beschichtete Objektträger aufgezogen und getrocknet. Für die Färbelösung wurden 25g Ölrot-O (Merck11669) mit 2,5l Isopropylalkohol (Merck 9634) versetzt, 6ml dieser Lösung wurden mit 4ml Aqua destillata 24h belassen und dann gefiltert. Nach 30 minütiger Färbung in dieser Färbelösung wurde mit Aqua destillata ausgewaschen, dann in 60% Isopropylalkohol differenziert. Die Kerne wurden mit Hämalaun 4 Minuten gefärbt, der Überschuss mit Aqua destillata abgewaschen und unter fließendem Leitungswasser 10 Minuten gebläut. Die Schnitte wurden luftgetrocknet und mit Glycerin-Gelantine (Merck, 9242) bei 60°C eingedeckt.

Die Schnitte wurden lichtmikroskopisch auf ihre Anfärbbarkeit für Lipide beurteilt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Elektronenmikroskopie

Die Schicht der Photorezeptoren, das retinale Pigmentepithel, die Bruchsche Membran und die Choriokapillaris wiesen bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung pathologische Befunde bei den Mäusen der Gruppen 3, 4, 5 und 6 im Vergleich zu den Kontrollgruppen 1 und 2 auf. Zahlen in Klammern weisen auf den Anteil der betroffenen Tiere in der einzelnen Gruppe hin.

#### 4.1.1. Choriokapillaris

Während die Gefäße der Choriokapillaris bei den Kontrollgruppen (1 und 2) ein stark gefenestertes, dünnes Endothel, eine endotheliale Basalmembran mit einer maximalen Breite von  $0,03\mu\text{m}$  und ein weites Gefäßlumen aufwiesen, wie Abb.2A zeigt, war das Lumen der Gefäße bei vielen Mäusen der Gruppen 3 (5/7), 5 (5/6) und 6 (4/5) verengt oder völlig kollabiert (Abb.2B). Die Fenestrierung des Endothels war bei Mäusen der Gruppen 3 (2/7), 5 (4/6) und 6 (5/5) stark rarefiziert und streckenweise überhaupt nicht mehr nachzuweisen (siehe Abb.2B und Abb.2C). Bei einzelnen Mäusen der Gruppe 6 (2/5) kam es zu einer erheblichen Verdickung der endothelialen Basalmembran der Gefäße auf bis zu  $0,07\mu\text{m}$  (siehe Abb.2C).

Ein regionales Verteilungsmuster für diese Veränderungen in zentralen oder peripheren Netzhautabschnitten konnte nicht nachgewiesen werden.

Das semiquantitative Beurteilungsschema für diese Veränderungen zeigt Tab.4:

Gruppe	1	2	3	4	5	6
∅ Basalmembran in $\mu\text{m}$	$0,029 \pm 0,03$	$0,029 \pm 0,08$	$0,051 \pm 0,03$	$0,049 \pm 0,22$	$0,059 \pm 0,18$	$0,065 \pm 0,22$
∅ Gefäßlumen in $\mu\text{m}$	$2,7386 \pm 0,06$	$3,5494 \pm 0,70$	$0,56305 \pm 0,33$	$1,7933 \pm 0,86$	$0,6402 \pm 0,43$	$1,7252 \pm 0,26$

Tab.4: Veränderungen der Choriokapillaris

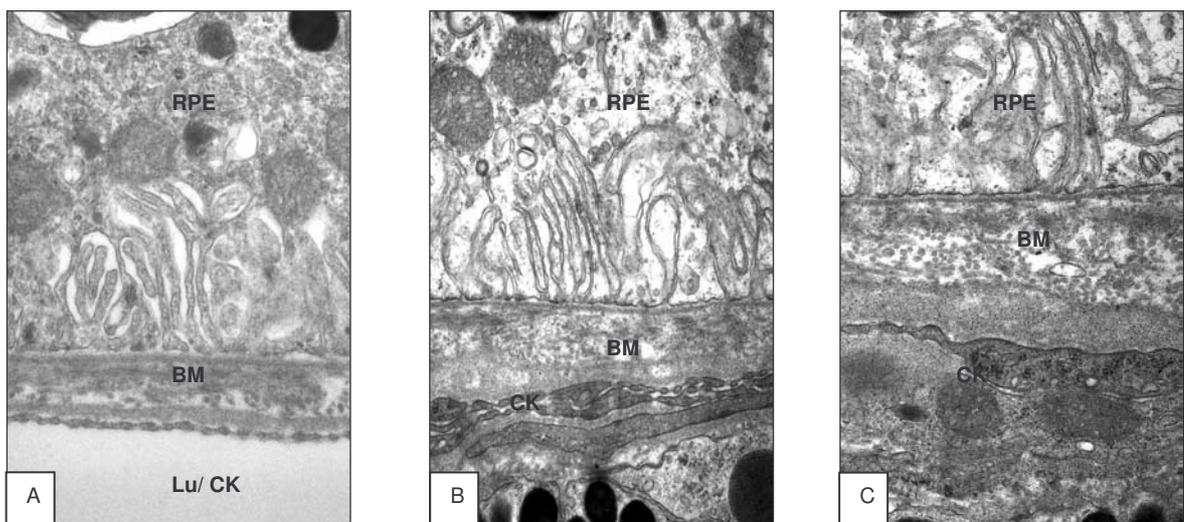


Abb.2: Veränderungen in der Choriokapillaris:

A: Fenestriertes Endothel der Kapillaren, weites Gefäßlumen und physiologische Basalmembran, Gr. 2

B: reduzierte Fenestrierung und enges Lumen, Gr.6.

C: durchgehendes Endothel ohne Fenster, starker Dickenzuwachs der endothelialen Basalmembran, Gr.6.

RPE: retinales Pigmentepithel, BM: Bruchsche Membran, CK: Choriokapillaris, Lu: Lumen (Vergrößerung 21560 fach)

#### 4.1.2. Bruchsche Membran

Die Schichtung der Bruchschen Membran ließ sich bei der Maus analog zum menschlichen Auge (NAUMANN 2000) nachvollziehen: die Basalmembran des RPE bildete die erste Schicht, es folgten kollagene Fibrillen, eine Membrana elastica, eine zweite Kollagenfaserschicht und die Basalmembran der Endothelzellen der Choriokapillaris (siehe Abb.3A). Die Gesamtdicke betrug  $0,56 - 0,65\mu\text{m}$  bei den Kontrollgruppen 1 und 2. Eine

Abnahme der Schichtdicke kam bei den Gruppe 3, 4, 5 und 6 durch Kondensation der kollagenen und elastischen Fasern der Bruchsches Membran, eine fokale Zunahme der Dicke der Bruchsches Membran durch Einlagerung einer elektronentransparenten Substanz zustande (siehe Abb. 3). Strukturveränderungen der Bruchsches Membran wurden vereinzelt bei Gruppe 2 (2/7), häufig bei Gruppe 3 (4/7) und 4 (3/5) und stets bei den Gruppen 5 (6/6) und 6 (5/5) nachgewiesen. Hier kam es zur Verquellung der kollagenen und elastischen Fasern, die ursprüngliche Schichtung war in diesem Bereich nicht mehr darstellbar (siehe Abb.3B). Eine Zuordnung dieser Strukturabweichung zu bestimmten Regionen des Augenhintergrundes gelang nicht.

Vakuolen (siehe Abb.3C) in der Bruchsches Membran traten in den Gruppen 3 (4/7), 4 (3/5), 5 (6/6) und 6 (5/5) auf. Diese Vakuolen erschienen elektronenmikroskopisch als optisch leere, membranbegrenzte, rundlich-ovale Strukturen mit einem Durchmesser von 0,1 bis 0,75µm. Die Gesamtdicke der Bruchsches Membran wuchs an diesen Stellen auf bis zu 0,8µm an (siehe Tab.5).

Diese Veränderungen der Bruchsches Membran traten bei den Mäusen der Gruppen 3 und 4 nur fokal auf, bei Gruppen 5 und 6 war vereinzelt auch die gesamte Bruchsche Membran gleichmäßig betroffen. Tab.5 zeigt die Veränderungen der Bruchsches Membran in einer schematischen Übersicht.

Gruppe	1	2	3	4	5	6
Kondensation der kollagenen Fasern	-	±	++	+++	+++	+++
Einlagerungen vakuoliger Substanz	-	-	++	+++	+++	+++
Ø Durchmesser der Einlagerungen in µm	-	-	0,17 ± 0,07	0,26 ± 0,16	0,25 ± 0,12	0,45 ± 0,21
Ø Schichtdicke der BM in µm	0,32 ± 0,08	0,55 ± 0,12	0,56 ± 0,09	0,29 ± 0,05	0,63 ± 0,23	0,65 ± 0,19

Tab.5: Veränderungen der Bruchsches Membran

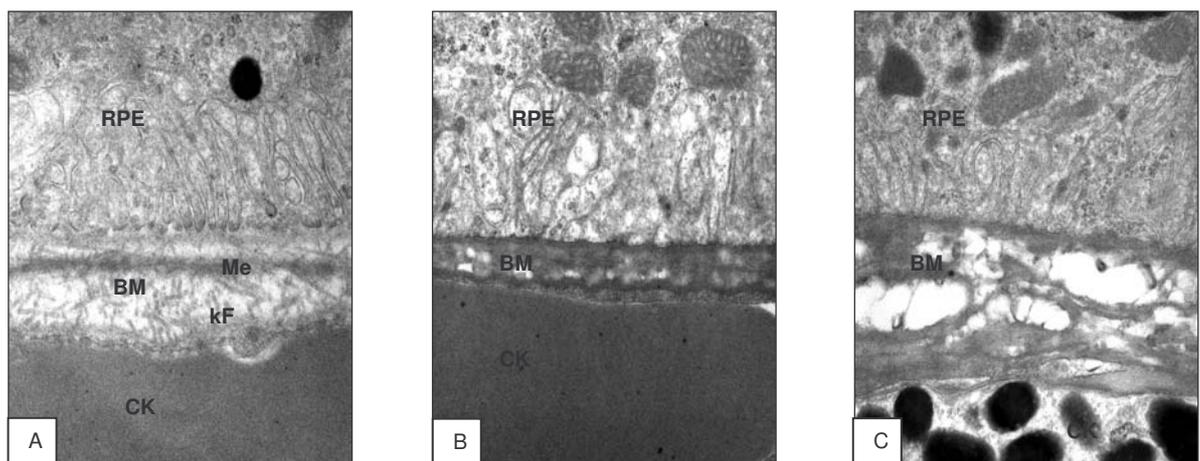


Abb. 3:Veränderungen der Bruchsches Membran:

A: Physiologische Schichtung der Bruchsches Membran, die kollagenen Fibrillen grenzen sich deutlich von der Membrana elastica ab, auch die begrenzenden Basalmembranen sind zu erkennen, Gr.1.

B: Verquellung der einzelnen Schichten, Verringerung der Schichtdicke, Gr.3.

C: Aufhebung der Schichtung, Dickenzuwachs, großen Lipidansammlungen in der Bruchsches Membran und Veränderungen in basalem Labyrinth und in der Choriokapillaris, Gr.6.

RPE: retinales Pigmentepithel, BM: Bruchsche Membran, CK: Choriokapillaris, Me: Membrana elastica, kF: kollagene Fibrillen (Vergrößerung 21560 fach)

#### 4.1.3. Retinales Pigmentepithel

Das RPE stellte sich als einreihige Lage kubischer Zellen dar. Die Höhe des RPE betrug 6,74 – 7,32  $\mu\text{m}$  in den Kontrollgruppen 1 und 2 und 4,96 – 8,81  $\mu\text{m}$  in den Gruppen 3 bis 6, wobei bei den LDL-Rezeptor-knockout Mutanten eine deutliche Reduktion der Zellhöhe festgestellt werden konnte (siehe Tab.6). Die Zellkerne lagen vorwiegend basal, apikal reichte ein Mikrovillisaum in die Außensegmente der Photorezeptoren (siehe Abb.4A). In allen Zellen konnten zahlreiche Mitochondrien, Polyribosomen, Zisternen des rauhen endoplasmatischen Retikulums, Phagosomen in variierender Anzahl, und ovale Melanosomen nachgewiesen werden.

Eine Vermehrung der Zellorganellen (Mitochondrien, Ribosomen, endoplasmatisches Retikulum), als potentieller Ausdruck erhöhter Stoffwechselaktivität, konnte bei vereinzelt Mäusen der Gruppen 2 (2/7), einigen Mäusen der Gruppe 4 (3/5), vielen Mäusen der Gruppe 3 (6/7) und 5 (5/6) und bei allen Mäusen der Gruppe 6 (5/5) beobachtet werden.

Bei vielen Mäusen der Gruppen 3 (5/7), 5 (6/6) und 6 (5/5) fanden sich zusätzlich Einlagerungen rundlich-ovaler, membranbegrenzter, 0,2-1,3  $\mu\text{m}$  großer Vakuolen mit elektronentransparentem Inhalt im Zytoplasma der RPE-Zellen (siehe Abb.4B und Abb.4C).

Den Abschluss zur Bruchschens Membran stellte ein basales Labyrinth, eine Einfaltung der basalen Zellmembran, zur Vergrößerung der resorbierenden Zelloberfläche, dar.

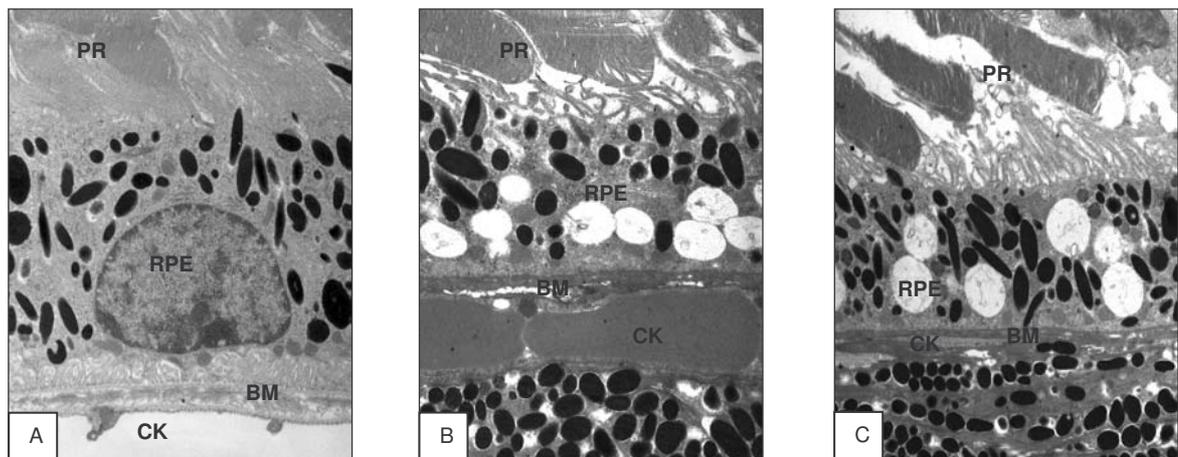


Abb. 4: Veränderungen des RPE:

A: Physiologisches RPE, apikal dichter Mikrovillisaum, basal intaktes Labyrinth, unverändertes Zytoplasma einer Maus aus der Kontrollgruppe 2

B: basale Ansammlung von Vakuolen, apikal atrophiertes Mikrovillisaum bei einer Maus aus Gr.5.

C: Verteilung der Lipidansammlung über das gesamte RPE mit Veränderungen der Bruchschens Membran und der Choriokapillaris, sowie der Photorezeptor Außensegmente, Maus aus Gr.6.

PR: Photorezeptor, RPE: retinales Pigmentepithel, BM: Bruchschens Membran, CK: Choriokapillaris (Vergr. 5481 fach)

Bei den Mäusen der Kontrollgruppen (1 und 2) stellten sich diese Einfaltungen der RPE-Zellen sehr deutlich dar (siehe Abb.5A), bei einigen Mäusen aus den Gruppen 5 (2/6) und 6 (3/5) kam es zur zunehmenden Rarefizierung und Abflachung der basalen Membraneinfaltungen, wie Abb.5B und Abb.5C zeigen.

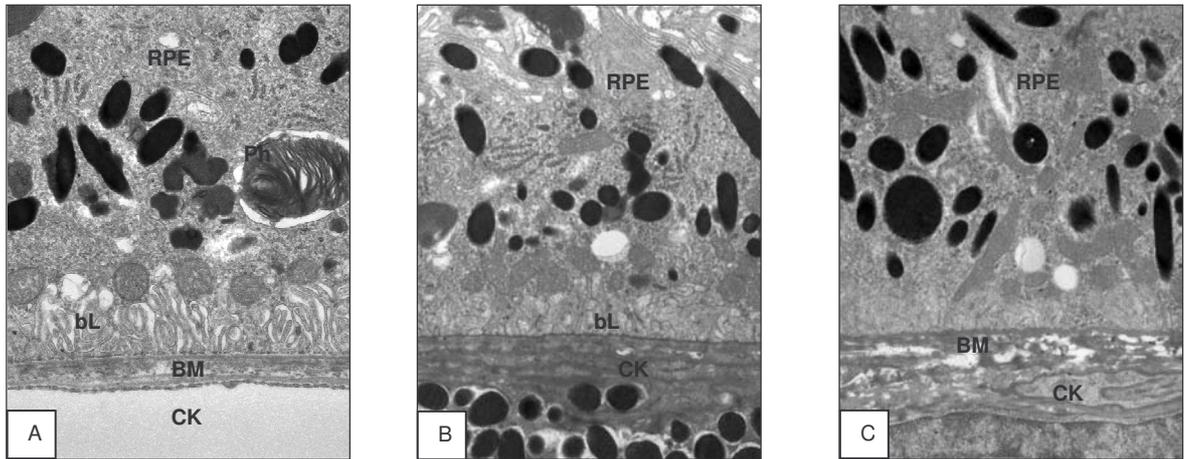


Abb.5: Veränderungen des basalen RPE:

A: Gesundes RPE einer Maus der Gr. 2, Einfaltungen des basalen Labyrinths stellen sich deutlich dar, Zellorganellen repräsentieren den aktiven Stoffwechsel.

B: Abflachung des basalen Labyrinths, Lipidpartikel im RPE über einer bereits veränderten Bruchschsche Membran einer Maus aus Gr.5.

C: Lipidvakuolen vermehrt, basales Labyrinth degeneriert, Veränderungen einer Maus aus Gr.6.

RPE: retinales Pigmentepithel, Ph: Phagosom, bL: basales Labyrinth, BM: Bruchsche Membran, CK: Choriokapillaris (Vergrößerung 10000 fach)

Diese Veränderungen konnten in allen Bereichen des RPE beobachtet werden, sie werden in Tab.6 zusammengefasst.

Gruppe	1	2	3	4	5	6
Gehalt an Zellorganellen	-	±	+++	+	++	+++
Vakuolen	-	±	++	+++	+++	+++
Ø Höhe des RPE in µm	7,32 ± 1,04	6,74 ± 1,31	8,81 ± 1,38	6,10 ± 0,77	5,36 ± 1,45	4,96 ± 1,06

Tab.6: Veränderungen des retinalen Pigmentepithels

#### 4.1.4. Sensorische Netzhaut

Die meisten Schichten der sensorischen Retina wiesen beim Vergleich der LDL-Rezeptor-knockout Mäuse zu den Kontrollmäusen keine Unterschiede auf.

Veränderungen fanden sich nur in der Schicht der Photorezeptoren. Die Mehrzahl der Photorezeptor-Außensegmente konnten als Stäbchen identifiziert werden, es fanden sich nur sehr vereinzelt Zapfen. In den Kontrollgruppen zeigten die Photorezeptoren eine regelrechte Struktur. Die Photorezeptor-Innenglieder wiesen Ansammlungen von Mitochondrien auf; die Außenglieder setzten sich aus parallel verlaufenden Membranen abgeflachter Bläschen zusammen (siehe Abb.6A).

Veränderungen in der Schicht der Photorezeptoren zeigten sich bei Mäusen in den Gruppen 3, 4, 5 und besonders in der Gruppe 6. Über zum Teil großflächige Areale erschienen die Außensegmente der Photorezeptoren in den betroffenen Gruppen degeneriert und zeigten, vor allem in ihren zentralen Abschnitten, Strukturverluste (Abb.6C). Häufig kam es zum völligen Kontaktverlust der Disci untereinander, einzelne Außensegmente fehlten sogar vollständig (siehe Abb.6C).

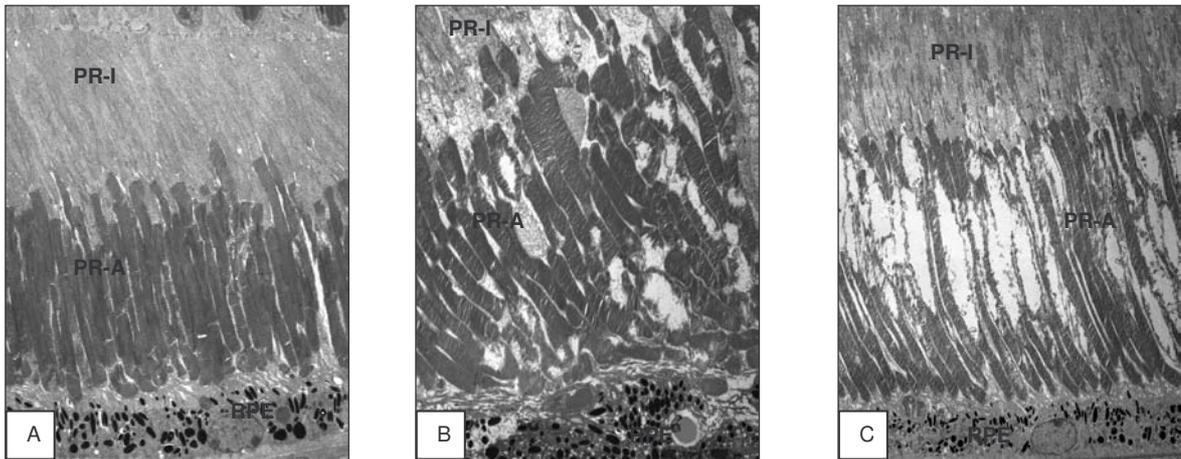


Abb. 6: Veränderungen der Photorezeptoren:

A: die Innensegmente stellen sich homogen dar, die Außensegmente sind in regelmäßiger Reihung angeordnet, basal liegt das unveränderte RPE, Photorezeptoren einer Kontrollmaus aus Gr.2.

B: vereinzelte Kontaktverluste unter den einzelnen Disci der Außensegmente einer Maus aus Gr.3.

C: degenerierte Innen- und Außensegmente einer Maus aus Gr.6.

PR-I: Photorezeptor-Innensegmente, PR-A: Photorezeptor-Außensegmente, RPE: retinales Pigmentepithel (Vergrößerung 1293 fach)

Das Auftreten der degenerierten Photorezeptor-Außensegmente in den verschiedenen Gruppen verdeutlicht Tab.8.

Gruppe	1	2	3	4	5	6
Anteil defekter Außensegmente	-	-	±	±	±	++

Tab.8: Veränderungen der Photorezeptoren

#### 4.2. Ergebnisse Ölrot-O Färbung

Die mit Hämalan gefärbten Zellkerne der äußeren Körnerschicht, der Chorioidea und der Sklera stellen sich blau dar. Im Bereich der Netzhaut und der Aderhaut waren bei den Mäusen der Kontrollgruppen 1 und 2 keine Ölrot-O positiven Strukturen zu beobachten. Ölrot-O positives, leuchtend rot angefärbtes orbitales Fettgewebe diente als interne Positivkontrolle (siehe Abb.7C). Die chorioidalen Strukturen, einschließlich der Choriokapillaris waren aufgrund des hohen Melaningehalts nicht zu beurteilen (Abb.A).

Abweichungen von diesem Normbefund traten in der Bruchschen Membran und im RPE der Gruppen 3, 5 und 6 auf. In der Bruchschen Membran fanden sich teils fokale, teils laminaire Einlagerungen von Lipiden (Abb.7D und E). Im retinalen Pigmentepithel konnten tropfenförmige Lipidablagerungen nachgewiesen werden.

Die Befunde der Ölrot-O Färbung (siehe Abb.7) bestätigen die Annahme, bei den elektronenmikroskopisch nachgewiesenen vakuoligen Substanzen handle es sich um Lipide.

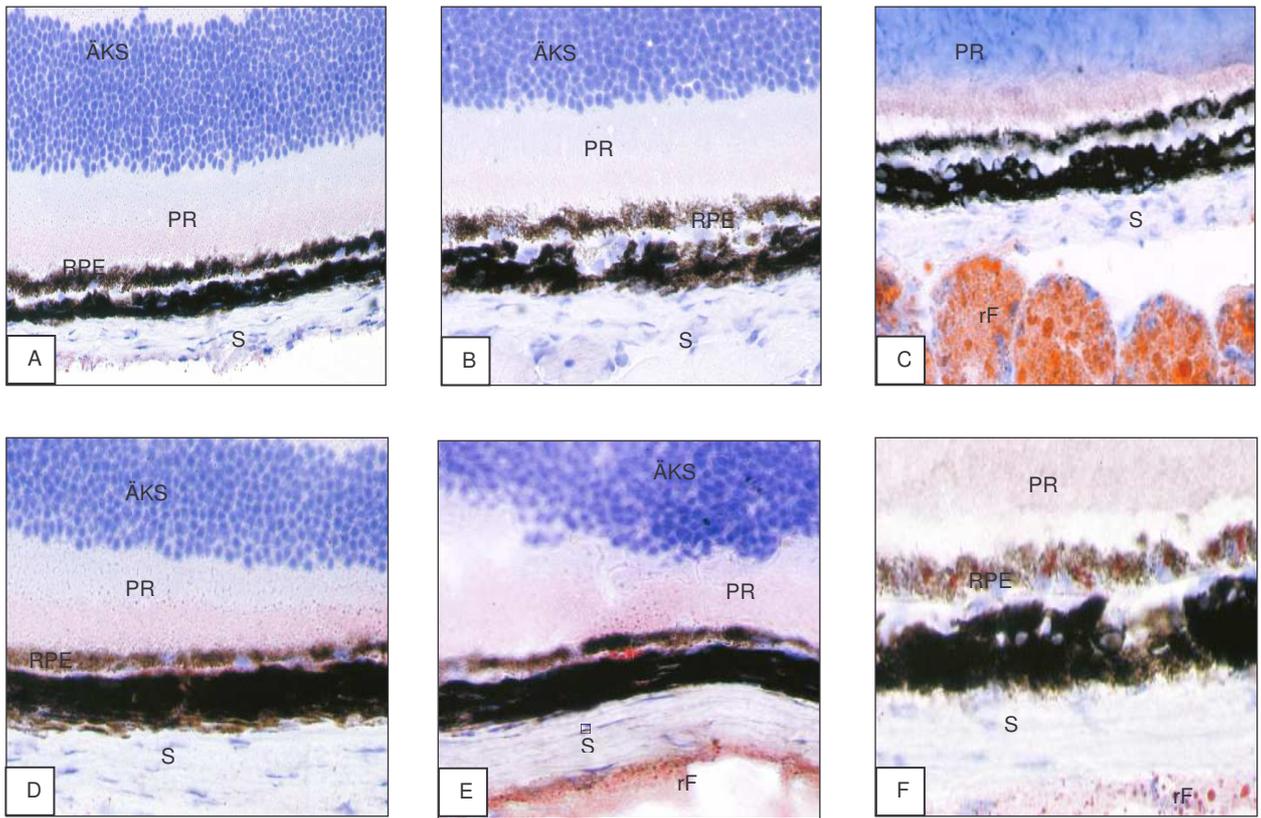


Abb. 7 Ölrot-O- Färbeergebnisse:

A-C: Kein Nachweis von Lipiden in sensorischer Netzhaut, RPE, Chorioidea und Sklera, deutliche Anfärbung des retrobulbären Fettgewebes, alles Gr.2

D: laminare Lipideinlagerung in der Bruchschens Membran einer Maus aus Gr.3

E: noduläre Lipideinlagerungen in der Bruchschens Membran einer Maus aus Gr.6

F: Lipidansammlungen im RPE, Maus aus Gr.6

ÄKS: äußere Körnerschicht, PR: Photorezeptoren (Innen- und Außensegmente), RPE: retinales Pigmentepithel, S: Sklera, rF: retrobulbäres Fettgewebe

## 5. Diskussion:

### 5.1. Beurteilung der Ergebnisse

Die elektronenmikroskopischen Befunde dieser Studie konnten zeigen, dass es bei fettreich gefütterten LDL-Rezeptor-knockout Mäusen zur Rarefizierung der Endothelfensterung, Einengung des Kapillarlumens und Zuwachs der endothelialen Basalmembranen der Choriokapillaris kommt. Auch Strukturveränderungen und die Verdickung der Bruchschens Membran durch Einlagerung von lipidhaltigem Material, die Akkumulation von Lipiden und degenerative Oberflächendifferenzierungen des retinalen Pigmentepithels, sowie degenerierte Photorezeptor-Außensegmente, zählten zu den pathologischen Veränderungen der Netzhaut und Aderhaut dieser Mäusemutanten im Vergleich zu den Kontrollmäusen. In der Chorioidea kam es zu den in Kap.4.1.1. beschriebenen Endothelveränderungen der Kapillaren. Dieser Befund korrelierte mit Alterationen in der Bruchschens Membran (siehe Kap.4.1.2.). Diese Veränderungen zeigten eine fortschreitende Progression von der Gruppe 3 zu den Gruppen 4, 5 und 6.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass erhöhte Serumlipidspiegel (siehe Tab.2), verursacht durch fettreiche Ernährung und die Fehlfunktion des LDL-Rezeptors, zum Austritt von Serumlipiden und Serumproteinen aus der Choriokapillaris führten, die dann in die Bruchsche Membran eingelagert wurden. Somit kam es zur Verdickung der Bruchschens Membran und zum Nachlassen ihrer Diffusionskapazität (STARITA et al. 1996). Dadurch erschwerte sich die nutritive Versorgung des RPE's und der Photorezeptoren.

Diese Störung des retinalen Metabolismus eskalierte wohl durch den stetigen Vorgang des „disc shedding“ (HJELMELAND et al. 1999), der Regeneration verbrauchter Photorezeptor-Außensegmente. Das in seiner Funktion geschädigte retinale Pigmentepithel der Mäuse aus Gruppe 3, 5 und 6 (siehe Kap.4.1.3.), könnte mit dieser Stoffwechsellast überfordert gewesen sein. So erklärt sich die beobachtete Zunahme der Zellorganellen im RPE (siehe Abb.5B) der betroffenen Mäuse als Adaptation an eine erhöhte Stoffwechsellast.

Da bei den fettreich gefütterten Individuen der Kontrollgruppe auch pathologische Befunde zu erheben waren (vergleiche Tab.5, Tab.6, Tab.7), kann die Fehlfunktion des LDL-Rezeptors nicht alleine für die aufgezählten Veränderungen verantwortlich gemacht werden. Die pathologischen Veränderungen treten bei der LDL-Rezeptor-knockout Maus aber verstärkt in Erscheinung. Entscheidenden Einfluss auf die Ausprägung der Veränderungen haben jedoch zusätzlich das Alter und die Fütterung der Tiere.

Die Befunde dieser Untersuchung zeigen graduelle Veränderungen, die den Initialstadien und der trockenen Form der AMD ähnlich sind (siehe Kap.5.2.), und das Arteriosklerosemodell unterstützen, deren Nutzen für die Überprüfung von Risikofaktoren und Therapieoptionen noch überprüft werden muss.

In der vorliegenden Form kann das Tiermodell als geeignet angesehen werden, Teilaspekte der Pathogenese von AMD-ähnlichen Befunden am Mäuseauge wiederzugeben.

## 5.2. Vergleich mit der Histopathologie der AMD

Erste histopathologische Anzeichen für das Vorliegen einer AMD sind nach GREEN (1999) diffuse Drusen, die so genannten „basal laminar deposits“ und „basal linear deposits“ (siehe Kap.1.4.) in der Bruchschen Membran. Darauf folgen die sekundären Veränderungen des RPE, die Entwicklung weicher Drusen, die Veränderungen der Bruchschen Membran, chorioideale Neovaskularisationen und die Atrophie des RPE und der Photorezeptoren.

Die Mäuse der Gruppe 3, 5 und 6 entwickelten mit den membranbegrenzten, elektronentransparenten Vesikeln Veränderungen, die den „basal linear deposits“ (nach DITHMAR et al. 2000: elektronentransparente Vesikel meist zwischen der Basalmembran des RPE und der inneren Kollagenschicht der Bruchschen Membran, siehe Kap1.4.) der AMD-Patienten gleichen, zudem innerhalb der Bruchschen Membran in den kollagenen Schichten zu finden waren (siehe Kap.4.1.2) und eine Anfärbarkeit für Lipide (siehe Kap.4.2. und Abb.7G, Abb.7H, Abb.7J) zeigten. Auch eine Atrophie des RPE's (siehe Kap.4.1.3. und Tab.6) und der Photorezeptoren (siehe Kap.4.1.4.) konnte besonders in Gruppe 6 beobachtet werden.

Die Ablagerung der Serumlipide in der Bruchschen Membran korrelierte mit dem erhöhten Serumlipidspiegel der Mäuse der Gruppen 3, 5 und 6 (siehe Tab.2 und Tab.5). Strukturveränderungen der Bruchschen Membran konnten bei den adulten Mäusen in den Gruppen 3, 5 und 6 nachgewiesen werden, diese wiesen ebenso erhöhte Serumlipidspiegel auf (vgl. Tab. 2 und Tab.5).

Somit unterstützen die Ergebnisse dieser Untersuchung das Arteriosklerose-Modell (siehe Kap.1.5.3) nach FRIEDMANN (2000).

## 5.3. Vergleich mit den Ergebnissen anderer Arbeiten

- ONG et al. (2001) untersuchten die Veränderungen der Retina von Bl/6- Mäusen im Vergleich zu Apo- E- Allel geschädigten Mäusen unter dem Einfluss von Diäten mit unterschiedlichem Fettgehalt. Die Autoren kamen hier zu dem Ergebnis, bei den Mäusen der Kontrollgruppe (Bl/6-Wildtypen, fettarme Fütterung) zeigten sich nur sehr wenige Veränderungen. Bei den Apo- E- Allel geschädigten Mäusen dagegen beobachteten die Untersucher in der inneren Körnerschicht der Netzhaut eine Kondensation des Chromatins im Zellkern und in der Umgebung des Kernes Vakuolen, die Bruchsche Membran erschien dicker und ihre elastische Schicht wies Lücken auf. Die Ausprägung dieser Befunde korrelierte mit dem Fettgehalt in der Nahrung.
- Eine Veränderung der Zellkerne wurde von DITHMAR et al. (2000) nicht beschrieben. Der Vergleich der vorliegenden Untersuchungsergebnisse mit den Ergebnissen von DITHMAR et al. (2001) für fettreich gefütterte Bl/6- Mäuse zeigt Übereinstimmungen. Die Autoren untersuchten neben lichttoxischen Effekten auch die Auswirkungen unterschiedlich fetthaltiger Diäten auf die Dicke und Beschaffenheit der Bruchschen

Membran und den Serumcholesterinspiegel von Mäusen. Dabei bemerkten sie eine Ähnlichkeit der pathologischen Befunde bei fettreich gefütterten Bl/6 Mäusen und früher untersuchten Apo- E defizienten Mäusen (DITHMAR et al. 2000): Die Bruchsche Membran der fettreich gefütterten Bl/6 Mäuse war verdickt und zeigte bei einem Teil der untersuchten Tiere Ablagerungen und Vakuolen in der Bruchschen Membran. Mit dem Alter und der Fettaufnahme der Tiere nahmen auch diese Veränderungen zu. Bei den Tieren der Kontrollgruppen, die eine Normaldiät erhielten, kamen sie nicht vor.

- Nahezu identische Untersuchungsergebnisse für die Mäuse der Kontrollgruppe liefert der Vergleich mit der Arbeit von MICELLI et al. (2000). Die Autoren beschrieben den Einfluss des Fettgehaltes des Futters auf die Morphologie der Retina von Bl/6 Mäusen. Sie beobachteten bei den fettreich gefütterten Tieren, eine hohe Anzahl von Vakuolen im RPE, das zudem oft dünner erschien. Ebenso zeigte sich die Bruchsche Membran elektronendichter, oft gespalten oder enthielt amorphes Material und vakuolige Substrate. Diese Veränderungen zeigten sich nicht in der fettärmer gefütterten Kontrollgruppe.
- RUDOLF et al. (2004) beurteilten die Bruchsche Membran der, auch in dieser Studie untersuchten, Bl/6J-Mäuse und der LDL-Rezeptor-knockout Mutanten. Sie beobachteten bei ausnahmslos allen LDL-Rezeptor-knockout Mäusemutanten membrangebundene, transluzente Partikel, die Fütterung hatte keinen Einfluss auf diese Veränderungen. Die Autoren konnten keine Veränderungen der Bruchschen Membran bei den Bl/6J Wildtypen, selbst unter fettreicher Diät, beobachten.
- Neben anderen Befunden der Choriokapillaris, der Bruchschen Membran, des RPE's und der Photorezeptoren (siehe Kap.4.1.) konnten auch in der vorliegenden Untersuchung die transluzenten Partikel in der Bruchschen Membran beobachtet werden. Hier konnte jedoch ein starker Einfluss der Serumlipidspiegel (siehe Tab.2) und des Fettgehaltes im Futter aufgezeigt werden. So wiesen auch Tiere der Gruppe 3, und damit des Bl/6J-Wildtyp Stammes, diese lipidhaltigen Partikel auf (siehe Tab.5). Die gewonnenen Ergebnisse der Bl/6J-Wildtypmaus in den Gruppen 1, 2 und 3, lassen sich somit durch die Untersuchungsergebnisse von DITHMAR et al. (2001) und MICELLI et al. (2000) untermauern.

#### 5.4. Tiermodelle und AMD

Mäuse sollten bereits in einigen Tiermodellen über die Vorgänge an der alternden menschlichen Netzhaut Aufschluss geben:

- Die retinal dystrophic mouse (rd-Maus):  
NEUHARDT et al. (1999) stellten eine altersabhängige Choriokapillarisdegeneration bei den rd-Mausmutanten fest. Den Beginn des Krankheitsgeschehens stellt der

Verlust der Endothelfensterung dar, darauf folgt die restlose Atrophie der Choriokapillaris, mit Degeneration des RPE und der Photorezeptoren.

- Die senescence accelerated mouse (SA-Maus):  
MAJJI et al. (2000) untersuchten die Veränderungen des retinalen Pigmentepithels in SA-Mäusemutanten. Die Mäuse zeigten einen Dickenzuwachs der Bruchschen Membran, an anderer Stelle nahm die Dicke der Bruchschen Membran ab, RPE-Zellen zeigten Anzeichen der Atrophie und fettiger Degeneration. In der Bruchschen Membran konnten amorphes Material und pathologische Ablagerungen beobachtet werden. Auch Neovaskularisationen konnten die Autoren in diesem Modell nachweisen.
- Die Apo-E- Allel -/- Maus:  
DITHMAR et al. (2000) untersuchten die Veränderungen der Bruchschen Membran der Apo-E defizienten (-/-) Mutante im Vergleich mit einer Kontrollgruppe (Bl/6-Wildtyp-Mäuse). Sowohl eine Dickenzunahme der Bruchschen Membran, als auch die Ausbildung von Vakuolen in der Bruchschen Membran traten bei den Mäusen beider Gruppen auf, jedoch waren die Apo E -/- Maus stärker betroffen. Die Autoren kommen zu dem Ergebnis, dass die Schädigung des Apo-E Allels bei der Maus zur vermehrten Ablagerung von Stoffwechselendprodukten in der Bruchschen Membran führt. Die Morphologie dieser Veränderungen gleiche den Drusen (Basal linear Deposits) der altersabhängigen Makuladegeneration.  
Auch ONG et al. (2001, siehe Kap. 5.3.) halten die Apo- E- Allel defiziente Maus für ein wertvolles Instrument bei der Aufklärung der AMD.  
Die Befunde der Apo-E -/- Mäusemutante weisen Ähnlichkeiten zu denen der hier untersuchten Mäuse aus den Gruppen 3, 5 und 6 auf. DITHMAR et al. (2000) beschreiben Veränderungen des Endothels der Choriokapillaris in Form vakuoliger Endotheldegeneration.
- Die LDL-Rezeptor-knockout Maus:  
RUDOLF et al. (2004) stellten eine Ähnlichkeit ihrer Befunde (siehe Kap.5.3.) mit den Veränderungen bei AMD-Patienten fest und halten die LDL-Rezeptor-knockout Maus für geeignet, als Tiermodell für die Untersuchung weiterer Teilaspekte der Entwicklung von Neovaskularisationen zu dienen.

#### 5.5. Versuche mit der LDL-Rezeptor-knockout- Maus

Die LDL-Rezeptor-knockout Mausmutante gilt als etabliertes Tiermodell für die Entwicklung arteriosklerotischer Veränderungen des Menschen (MORI et al. 1999). Durch die Inaktivierung des LDL-Rezeptor-Gens entwickelten ISHIBASHI et al (1993) ein überlebensfähiges und fertiles Tiermodell für die Hypercholesterinämie des Menschen. In Ermangelung von LDL-Rezeptoren kann das Low Density Lipoprotein nicht mehr aus der

Blutbahn befördert werden, deswegen erreichen die Mäuse bis zu neunfach erhöhten Plasmaspiegel an LDL. Der Cholesterinspiegel der Mäuse verdoppelte sich, die Halbwertszeit von intravenös verabreichtem <sup>125</sup>I-VLDL stieg um das dreißigfache. Die HDL-Serumspiegel der Mäuse wichen dagegen nicht von denen der Kontrollgruppen ab. Die Kombination aus hohem LDL- und niedrigem HDL-Plasmaspiegel gilt als auslösender Faktor einer Arteriosklerose (KLINKE et al.1994).

- MORI et al. (1999) untersuchten die Gefäße der LDL-Rezeptor-knockout Maus. In diesem Versuch sollte sich herausstellen, ob die Gefäße auf Ischämie und Reperfusion anders reagierten, als die Gefäße der B6129-Wildtyp-Mäuse. Die Autoren verfolgten das Ziel, ein Tiermodell für die Arteriosklerose des Menschen zu entwickeln. Sie konnten eine dreifach stärkere Anhaftung von Leukozyten als Zeichen einer übertriebenen entzündlichen Antwort auf die Behandlung der postkapillaren Venolen bei den LDL-Rezeptor-knock-out Mäusen beobachten. Diese Befunde konnten nicht durch die Fütterung mit cholesterolreicher Nahrung verstärkt werden.
- SEHAYEK et al. (2001) untersuchten die Auswirkungen der Hyodeoxycholinsäure (HDCA) auf die Cholesterinspiegel und arteriosklerotische Gefäßveränderungen an Bl/6-Wildtyp-Mäusen und LDL-Rezeptor-knockout Mäusemutanten. LDL-Rezeptor-knockout Mutanten entwickelten in dieser Untersuchung sehr hohe Serumcholesterinspiegel (660 +/-130mg/dl) und entwickelten eine starke Arteriosklerose.

#### 5.6. AMD- Risikofaktor: Arteriosklerose

Viele Autoren kommen zu dem Schluss, dass Arteriosklerose und AMD gemeinsame Krankheitsaspekte aufweisen.

- Nach MULLINS et al. (2000) konnte in den Drusen viel Vitronectin festgestellt werden, ein Material, das auch aus anderen Ablagerungen altersabhängiger Erkrankungen isoliert wurde. Auch Lipide, Apolipoprotein E, Calcium und Komplement-Komponenten, die ebenso in arteriosklerotischen Ablagerungen vorkommen, konnten in Drusen festgestellt werden. Dennoch betonen die Autoren die Unterschiede in der Zusammensetzung zwischen den beiden krankhaften Ablagerungen. So konnte in den Drusen, das für Arteriosklerose typische Apolipoprotein B nicht nachgewiesen werden.
- Auch HAIMOVICI et al. (2001) untersuchten die Zusammensetzung der Drusen. Die Autoren beschrieben Cholesterinester und Triglyceride, selten Phospholipide. Apolipoprotein B ist, nach Aussage dieser Autoren, in den „basal laminar deposits“ an AMD erkrankter Augen nachgewiesen worden. Da die Quelle der nachgewiesenen Cholesterinester unbekannt war, konnte eine gemeinsame Pathogenese der Arteriosklerose und der AMD nicht nachgewiesen werden.

- VINGERLING et al. (1995) untersuchten in der Rotterdam Studie den Zusammenhang zwischen Arteriosklerose und dem Auftreten von AMD. Dabei konnten die Autoren bei den Menschen unter einem Lebensalter von 85 Jahren nachweisen, dass das Vorhandensein von arteriosklerotischen Ablagerungen in der Bifurkation der Arteria Carotis, das Risiko an AMD zu erkranken 4,7-fach erhöht. Die Ablagerungen an anderen Arterien stellte zumeist eine 2,5-fache Risikoerhöhung dar. VINGERLING et al. vertreten deswegen die Meinung, Arteriosklerose könnte an der Ätiologie der AMD ursächlich beteiligt sein.
- FRIEDMAN (2000) untersuchte die Rolle des arteriosklerotischen Prozesses in der Pathogenese der AMD. Er kam zu dem Ergebnis, AMD und Arteriosklerose teilten die Risikofaktoren und einige gemeinsame Mechanismen der Pathogenese: Degenerative Veränderungen von Elastin und Kollagen, vermehrte Bildung von Wachstumsfaktoren und Neovaskularisationen konnte er als gemeinsame pathogenetische Ansätze zwischen AMD und Arteriosklerose aufzeigen.
- CURCIO et al. (2001) untersuchten den Cholesterolgehalt der Bruchschen Membran und der Chorioidea menschlicher Augen. Nach den Autoren altert die Bruchsche Membran wie die Lamina intima der Arterien, besonders in der Region der Makula käme es zu einem hohen Anstieg des Cholesterolgehaltes in der Bruchschen Membran. Die Untersucher halten aus diesem Grund Gemeinsamkeiten im Pathomechanismus zwischen AMD und kardiovaskulären Erkrankungen für nahe liegend.

#### 5.7. AMD- Risikofaktor: fettreiche Ernährung und hoher Body Mass Index

Sehr kontroverse Untersuchungsergebnisse sind im Hinblick auf den ursächlichen Zusammenhang zwischen Fettgehalt in der Nahrung, bzw. Gewicht der Betroffenen und dem Auftreten der AMD zu verzeichnen.

- Nach SEDDON et al. (2003) stieg das Risiko des Fortschreitens einer bestehenden AMD mit dem Übergewicht der betroffenen Patienten. Hoher Body Mass Index, großer Hüftumfang und hoher Bauchfettanteil wurden als Risikofaktoren bestätigt. Demgegenüber scheint körperliche Betätigung das Risiko des Fortschreitens der Erkrankung zu mindern.
- In der „Age-related-eye-disease-study“ (AREDS 2000) konnten die Autoren einen Zusammenhang zwischen erhöhtem Body Mass Index und stark ausgeprägter AMD mit chorioidaler Neovaskularisation feststellen.
- Noch weiter gehen die Autoren HIRVELA et al. (1996). Sie erklärten den erhöhten Body Mass Index bei Männern zum einzig nachgewiesenen Verursacher der AMD neben dem Alter. Als weitere Verursacher wurden untersucht: systemischer Bluthochdruck, Diabetes, Rauchen, UV-Strahlen- Exposition, Myopie und Glaukom.

Dabei konnten, nach diesen Autoren, keine Abhängigkeiten zur AMD nachgewiesen werden.

#### 5.8. Eignung als Tiermodell

In dieser Untersuchung konnten retinale Veränderungen bei LDL-Rezeptor-knockout Mäusen und fettreich gefütterten Bl/6J Wildtypmäusen nachgewiesen werden.

Die Ausprägung der pathologischen Befunde war altersabhängig, so wiesen die Mäuse der Gruppen 3, 5 und 6 eine stärkere Verdickung der Basalmembran der Choriokapillaris (siehe Kap.4.1.1.) auf, zeigten deutlichere Strukturveränderungen der Bruchschens Membran (siehe Kap.4.1.2.) und des RPE (siehe Kap.4.1.3.), als die juvenilen Tiere ihres Stammes.

Ferner zeigte die Ausprägung der pathologischen Befunde auch eine Abhängigkeit von dem Fettgehalt in der Nahrung bzw. dem Serumcholesterinspiegel der untersuchten Mäuse. So korrelierte der stark erhöhte Serumcholesterinspiegel der Mäuse aus Gruppe 6 (siehe Tab.2) mit den deutlichsten Veränderungen der Choriokapillaris (siehe Abb.2C), der Bruchschens Membran (siehe Abb.3C), des RPE (siehe Abb.4C) und der Photorezeptoren (siehe Abb.6C). Die genetische Disposition (Funktionsverlust des LDL-Rezeptors) führte zu stärkeren Veränderungen in der Netzhaut, so zeigten alle untersuchten Veränderungen in den Gruppen 5 und 6 ihre deutlichste Ausprägung (Vergleiche Tab.4, Tab.5, Tab.6, Tab.7).

Aufgrund der Ähnlichkeit der Ergebnisse, erfolgt eine Beurteilung der Eignung der LDL-Rezeptor-knockout Mäuse und der Bl/6J-Wildtypen als Tiermodell für die AMD wie bei MICELELLI et al. (2000): Die Autoren halten die fettreich gefütterten Bl/6-Mäuse für geeignet die histopathologischen Veränderungen bei der AMD wiederzugeben.

MICELELLI et al. (2000) haben in ihrer Untersuchung die Einwirkung der Risikofaktoren Alter und Ernährung dargestellt, in der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich eine mögliche genetische Prädisposition gezeigt.

Einige Autoren (HIRVELA et al. 1996, SMITH et al. 2001, SEDDON et al. 2003) halten genau diese Risikofaktoren (Alter, Ernährung und genetische Disposition) für die Verursacher der AMD des Menschen.

In dieser Untersuchung zeigten sich altersassoziierte Befunde, die bei fettreicher Ernährung gravierende strukturelle Veränderungen der Choriokapillaris, Bruchschens Membran, des RPE und der sensorischen Netzhaut nach sich zogen (siehe Kap.4.1.). Die LDL-Rezeptor-knockout Mausmutante zeigte die gleichen Veränderungen, nur in intensiverer Ausprägung als die Mäuse der Gruppe 3. Juvenile Tiere dieser Mäusemutante wiesen bereits Veränderungen in der Choriokapillaris, der Bruchschens Membran und des RPE auf, während junge Bl/6J-Wildtyp Mäuse keine pathologischen Befunde in den untersuchten Augenabschnitten aufwiesen.

Die gewonnenen Ergebnisse unterstützen das Arteriosklerose-Modell (siehe Kap.1.5.3.), da die Veränderungen der retinalen und chorioidalen Strukturen (siehe Kap.4.1.) und die Ölrot-O-positiven Lipidansammlungen (siehe Kap.4.2.) mit dem Serumlipidspiegel der Mäuse

(siehe Tab.2) korrelierte und die Choriokapillaris vaskuläre Strukturveränderungen aufwies (siehe Kap.4.1.1.).

Ultrastrukturelle Parallelen zu den histologischen Befunden von AMD-Patienten finden sich in der Ausbildung von Lipidansammlungen in der Bruchschen Membran, die mit den „basal linear deposits“ des Menschen vergleichbar sind und in der strukturellen Veränderung des RPE und der Photorezeptoren (siehe Kap. 5.2.).

Die LDL-Rezeptor-knockout Mäusemutanten, besonders in Kombination mit fettreich gefütterten Bl/6J- Wildtypmäusen, eignen sich somit als Tiermodelle für die Initialstadien und die trockene Form der AMD.

## 6. Zusammenfassung

Die altersabhängige Makuladegeneration (kurz: AMD) ist die häufigste Erblindungsursache der älteren Menschen in der westlichen Welt. Bisher lassen sich die genauen Vorgänge der Krankheitsentstehung und des Fortschreitens noch nicht vollständig erklären. Vielfach wurden aber durch Studien Gemeinsamkeiten zwischen der AMD und der Arteriosklerose aufgedeckt. Da die existierenden Tiermodelle nur einzelne Teilaspekte des Krankheitsgeschehens widerspiegeln, kann derzeit noch nicht auf ein etabliertes Tiermodell für diese komplexe Erkrankung zurückgegriffen werden.

Als Ziel der vorliegenden Arbeit galt es, die Eignung der LDL-Rezeptor-knockout Mutante des Bl/6J-Mäusestammes als Modell für die AMD zu überprüfen, da diese Maus, durch die Ausbildung von Gefäßschäden, bereits ein etabliertes Arteriosklerose-Tiermodell ist.

Im Detail beschäftigt sich diese Untersuchung mit der Netzhaut und der Aderhaut von 16 LDL-Rezeptor-knockout Mäusemutanten und 17 Wildtypmäusen als Kontrolltiere. Aus jeder Gruppe wurden junge und erwachsene Tiere untersucht. Die adulten Mäuse erhielten entweder fettarmes oder fettreiches Futter. Die Untersuchung führte zu dem Ergebnis, dass die Mäusemutanten altersabhängig und durch den Fettgehalt der Ernährung beeinflusst, Veränderungen in den Kapillaren der Aderhaut, Lipideinlagerungen in der Bruchschens Membran und im retinalem Pigmentepithel der Netzhaut entwickelten und dass Photorezeptoren degenerierten. Ähnliche Veränderungen konnten, allerdings in gradueller Abstufung, auch bei den Wildtypmäusen mit fettreicher Fütterung beobachtet werden. Die jungen Wildtypmäuse und die Adulten unter fettarmer Diät zeigten diese pathologischen Befunde nicht.

Aufgrund der histopathologischen Ähnlichkeit der Befunde mit den Veränderungen bei der AMD und aufgrund des Fehlens von Neovaskularisationen, eignet sich die LDL-Rezeptor-knockout Mausmutante als Tiermodell für die Initialstadien und die trockene Form der AMD, da gegenüber der Wildtyp-Maus eine gesteigerte Disposition, AMD-ähnliche Symptome zu entwickeln, vorliegt.

## 7. Summary

### **Retinal and Chorioidal Changes of LDL-receptor-knockout mice as a Model for Age-related Macular Degeneration**

Age-related Macular degeneration (AMD) is a common reason for blindness among elderly people in the western world. Changes in retina and chorioidea cause loss of function in the central sight. AMD occurs in two forms: the common dry form and the aggressive wet form. First the dry form affects the metabolism of the retina, so that the photoreceptor cells slowly degenerate. The aimless growth of blood vessels, neovascularisation or wet form of the AMD, can cause severe complications. Until now the complete pathogenesis of this disease is not known. No reliable animal model exists at the moment. Some studies showed similarities between AMD and arteriosclerosis.

The aim of this study was to proclaim the LDL-receptor-knockout mouse as a possible animal model for AMD. This mouse mutant is an animal model for arteriosclerosis.

We studied retina and chorioidea of 16 LDL receptor knockout mutants and 17 Bl/6J wildtype animals. Groups were divided in young and adult animals, the adults were fed with two diets, containing normal or enriched amount of fat.

Elektron microscopic and histochemical techniques showed that the mutants develop alterations of the choriocapillaris, lipid deposits in Bruchs membrane and RPE and show degenerated photoreceptor segments. These changes depended on age and fat content of the diet. The same changes were seen in the wildtype mice on high fat diet, but the expression was less significant. Young mice and Bl/6J mice on a low fat diet did not show these changes.

As the results show similarities with the changes in AMD, although no neovascular development was seen, the LDL-receptor-knockout mutant could be used as an animal model for the early stages and the dry form of AMD.

## 8. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AMD	altersabhängige Makuladegeneration
AREDS	Age related eye disease study
ARVO	Association for Research in Vision & Ophthalmology
Bl/6J	Name des Wildtyp-Mäusestamms der Kontrollgruppen
BlamD	basal laminar deposits (siehe Kap.3.4.)
BlinD	basal linear deposits (siehe Kap.3.4.)
BM	Bruchsche Membran
CK	Choriokapillaris
EM	Elektronenmikroskop
g	Gramm
Gr.	Gruppe
h	Stunde
HDL	High density lipoprotein
HF	High Fat- Diet, fettreiche Diät der adulten Mäuse (siehe Kap.5.1.)
IDL	Intermediate density lipoprotein
Kap.	Kapitel
l	Liter
LDL	Low density lipoprotein
LDL-/-	LDL- Rezeptor-knockout Mausmutante
Nr.	Nummer
peri.	peripher
PR	Photorezeptoren
RPE	retinales Pigmentepithel
S	Sklera
Tab.	Tabelle
VLDL	Very low density lipoprotein
zent.	zentral

## 9.Literaturverzeichnis

AREDS COORDINATION CENTER AGE-RELATED EYE DISEASE STUDY RESEARCH GROUP (2000)

Risk Factors associated with Age-related Macular Degeneration. A Case-Control Study in the Age-related Eye Disease Study: Age-related Eye Study Report Number 3  
Ophthalmology Vol. 107; pp.2224-2232

P.BÖCK (1998)

ROMEIS, Mikroskopische Technik

Urban und Schwarzenberg- Verlag, 17.Auflage; pp.375-408

P.CAMPOCHIARO (1999)

The Pathogenesis of Age-related Macular Degeneration

Molecular Vision 1999, Vol. 5; p.24

T.A. CIULLA (2001)

Evolving pathophysical Paradigms for Age related Macular Degeneration

British Journal of ophthalmology, Vol. 85 (5), pp.510-512

C.CURCIO, C.MILLICAN, T.BAILEY, H.KRUTH (2001)

Accumulation of Cholesterol with Age in Human Bruch´s Membrane

Investigative Ophthalmology & Visual Science, Vol. 42; No.1, pp.265-274

S.DITHMAR, N.SHARARA, C.CURCIO, N.LE, Y.ZHANG, S.BROWN, H.GROSSNIKLAUS (2001)

Murine High- Fat Diet and Laser Photochemical Model of Basal Deposits in Bruch Membrane

Archives of Ophthalmology, Vol. 119; pp.1643-1649

S.DITHMAR, C.CURCIO, N.LE S.BROWN, H.GROSSNIKLAUS (2000)

Ultrastructural Changes in Bruch´s Membrane of Apolipoprotein E-Deficient Mice

Investigative Ophthalmology & Visual Science, Vol. 41; No.8, pp.2035-2042

E.FRIEDMAN (2000)

The Role of the Atherosclerotic Process in the Pathogenesis of Age-related Macular Degeneration

American Journal of Ophthalmology, Vol. 130; No.5, pp.658-663

- R.GREEN (1999)  
Histopathology of Age-related Macular Degeneration  
Molecular Vision 1999, Vol. 5; pp27-36
- R.HAIMOVICI, D.GANTZ, S.RUMELT, T.FREDDO, D.SMALL (2001)  
The Lipid Composition of Drusen, Bruch's Membrane, and Sclera by hot Stage Polarizing Light Microscopy  
Investigative Ophthalmologie & Visual Sciences, Vol. 42; Vol.7, pp.1592-1599
- H.HIRVELA, H.LUUKINEN, E.LAARA, L.SC und L.LAATIKAINEN (1996)  
Risk Factors of Age-related Maculopathy in a Population 70 Years of Age or older  
Ophthalmology, Vol. 103; pp.871-877
- L.HJELMELAND, V.CRISTOFALO, W.FUNK, E.RAKOCZY, M.KATZ (1999)  
Senescence of the Retinal Pigment Epithelium  
Molecular Vision, Vol. 5 ; pp.33-36
- F.G. HOLZ, D.PAULEIKHOFF, R.F. SPAIDE, A.C. BIRD (2003)  
Die altersabhängige Makuladegeneration  
Springer-Verlag, 2.Auflage; p.55; pp.3-6
- L.HYMAN, A.SCHACHAT, Q.HE, M.C. LESKE (2000)  
Hypertension, cardiovascular Disease and Age-related Macular Degeneration. Age-Related Macular Degeneration Risk Factors Study Group  
Archives of Ophthalmology 2000, Vol. 118; pp.351-358
- S.ISHIBASHI, M.BROWN, J.GOLDSTEIN, R.GERARD, R.HAMMER, J.HERZ (1993)  
Hypercholesterolemia in Low Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice and its Reversal by Adenovirus-mediated Gene Delivery  
Journal of Clinical Investigation, Vol. 92; pp.883-893
- R.KLEIN, B.E.K.KLEIN, S.C.TOMANY, K.J.CRUICKSHANKS (2003)  
The Association of cardiovascular Disease with long-term Incidence of Age-related Maculopathy, The Beaver Dam eye study  
Ophthalmology, Vol. 110; pp.636-643
- R.KLINKE, S.SILBERNAGEL (1994)  
Lehrbuch der Physiologie  
Georg Thieme Verlag, 1.Auflage; p.187

E.C.KONDROT (2000)

Microcurrent Stimulation For The Treatment of Age-Related Macular Degeneration  
<http://eyecare.freeyellow.com/mcs.htm> , gesehen am 21.08.2003

P-L.LIP, A.D.BLANN, M.HOPE-ROSS, J.M.GIBSON, G.Y.H.LIP (2001)

Age-Related Macular Degeneration is associated with increased vascular endothelial growth Factor, Hemorheology and endothelial Dysfunction  
Ophthalmology, Vol. 108; pp.705-710

G.LUTTY, J.GRUNWALD, A.MAJJI, M.UYAMA, S.YONEA (1999)

Changes in Choriocapillaris and Retinal Pigment Epithelium (RPE) in Age-Related Macular Degeneration  
Molecular Vision, Vol. 5; pp.35-38

A.MAJJI, J.CAO, K.CHANG, A.HAYASHI, S.AGGARWAL, R.GREBE, E.JUAN. (2000)

Age-Related Retinal Pigment Epithelium and Bruch's Membrane Degeneration in Senescence-Accelerated Mouse  
Investigative Ophthalmology & Visual Science, Vol. 41; No.12, pp.3936-3942

M.MICELLI, D.NEWSOME, D.TATE JR., T.SARPHIE (2000)

Pathologic Changes in the Retinal Pigment Epithelium and Bruchs Membrane of fat-fed atherogenetic Mice  
Current Eye Research 2000, Vol. 20; pp.8-16

N.MORI, Y.HORIE, M.GERRITSEN, N.GRANGER (1999)

Ischemia-Reperfusion induced microvascular Responses in LDL-Receptor -/- Mice  
The American Physiological Society 1999; pp. H1647-H1654

R.F. MULLINS, S.R. RUSSEL, D.H. ANDERSON, G.S. HAGEMANN (2000)

Drusen associated with aging and Age-related Macular Degeneration contain Proteins common to extacellular Deposits associated with Atherosclerosis, Elastosis, Amyloidosis and Dense Deposit Disease  
The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal, Vol. 14; pp.835-846

G.O.H.NAUMANN (2000)

Pathologie des Auges  
Springer -Verlag, 2.Auflage, pp.64-70; pp.1089-1099; pp.1497-1498

T.NEUHARDT, C.MAY, C.WILSCH, M.EICHHORN, E.LÜTJEN-DRECOLL (1999)  
Morphological Changes of Retinal Pigment Epithelium and Choroid in rd-Mice  
Experimental Eye Research, Vol. 68; pp.75-83

J.ONG, N.ZORAPAPEL, K.RICH, R.WAGSTAFF, R.LAMBERT, S. ROSENBERG,  
F.MOGHADDAS, A.PIROUZMANESH, A.AOKI, M.KENNEY (2001)  
Effects of Cholesterol and Apolipoprotein E on Retinal Abnormalities in ApoE-Deficient Mice  
Investigative Ophthalmology & Visual Science, Vol. 42; No.8, pp.1891-1900

PRO RETINA (2003)

Altersabhängige Makuladegeneration– was ist das?  
PRO RETINA INFOSERIE, Vol. 13; p.8, pp.13-19

PRO RETINA (2000)

Makuladegeneration (MD) Was ist das?  
PRO RETINA INFOSERIE, Vol. 9; pp.16-23, p.32

M.RUDOLF, B.IVANDIC, J.WINKLER, U.SCHMIDT-ERFURTH (2004)

Akkumulation von Lipidpartikeln in der Bruchschens Membran von LDL-Rezeptor-defizienten  
Mäusen als Modell für die altersbezogene Makuladegeneration  
Ophthalmologie, Vol. 101; pp.715-717

U.SCHLÖTZER-SCHREHARDT (2000)

Drusen, Ergebnis einer Autoimmunreaktion?

Online Journal of Ophthalmology

<http://www.onjoph.com/global/beitraege/drusen/index-body.html> , gesehen am 17.2.2004

J.M.SEDDON, J.COTE, N.DAVIS, B.ROSNER (2003)

Progression of Age-related Macular Degeneration: Association with Body Mass Index, Waist  
Circumference, and Waist-Hip Ratio.

Archives of Ophthalmology, Vol. 121; pp.785-792

E.SEHAYEK, J.ONO, E.DUNCAN, A.BATTA, G.SALEN, S.SHEFER, L.NEGUYEN, K.YANG,  
M.LIPKIN, J.BRESLOW (2001)

Hyodeoxycholic Acid efficiently suppresses Atherosclerosis Formation and Plasma  
Cholesterol Levels in Mice

Journal of Lipid Research, Vol. 42; pp.1250-1256

C.STARITA, A.HUSSAIN, S.PAGLIARINI, J.MARSHALL (1996)  
Hydrodynamics of Ageing Bruch's Membrane: Implications for Macular Disease  
Experimental Eye Research, Vol. 62; pp.565-572

W.SMITH, J.ASSINK, R.KLEIN, P.MITCHELL, C.C.W.KLAVER, B.E.K.KLEIN, A.HOFMANN,  
S.JENSEN, J.J.WANG, P.T.V.M.de JONG (2001)  
Risk Factors for Age-related Macular Degeneration: Pooled Findings from three Continents  
Ophthalmology Vol. 108; pp.697-704

K.THOMPSON (2002)  
Treatment Options for ARMD  
[http://www.avclinic.com/treatment\\_options\\_for\\_armd.htm](http://www.avclinic.com/treatment_options_for_armd.htm) , gesehen am 5.10.2004

D.ULLRICH (2003)  
Research Focusses on Age-Related Macular Degeneration  
<http://www.healthlink.mcw.edu/article/1031002225.html>, gesehen am 21.08.2003

J.VINGERLING, I.DIELEMANN, M.BOTS, A.HOTMAN, D.GROBBEE, P.JONG (1995)  
Age-related Macular Degeneration is associated with Atherosclerosis. The Rotterdam Study  
American Journal of Epidemiology Vol. 142; pp. 404-409

M.WIEDERHOLT, H.BRÄUER, B.BRÄUER (1999)  
Excerpta ophthalmologica: Bildatlas zur Physiologie und Pathophysiologie der  
Mikrozirkulation des Auges  
München: Med.Service; p.20



## 10. Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Schlötzer-Schrehardt für die Bereitstellung des Themas, die Einweisung, die Unterstützung und die Betreuung. Sie hat diese Arbeit unter bestmöglichen Bedingungen ermöglicht.

Bei Frau Meyer bedanke ich mich ganz herzlich für die vielen gelungenen EM-Schnitte, die Färbungen, die Fotos und die Teepause.

Herrn Prof. Schmahl verdanke ich die Möglichkeit, diese Untersuchung in München einzureichen. Vielen Dank auch für die wertvollen Anregungen und die kritische Durchsicht der Arbeit.

Dr. Aherrahrou aus Lübeck gebührt Dank für die Überlassung der Mäuseaugen.

Dank gilt auch Frau Dr. Hagmayer und Frau Fruth für die vielen kleinen Ermunterungen und die genehmigten Urlaubstage.

Meiner Familie danke ich besonders für die Unterstützung und den Rückhalt, ich habe großes Glück, Euch zu haben!

