

Aus der Augenklinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Elektrophysiologische Untersuchungen
am Experimentellen Autoimmun Glaukom Modell**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Corinna Mühleib
aus Mülheim an der Ruhr

Mainz, 2010

Jeder neue Gedanke ist ein Widerspruch.
Denken heißt widersprechen können.

Hans Lohberger

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1 Grundlagen zum Glaukom	1
1.1.1 Ätiologie und Pathogenese des Glaukoms	1
1.1.2 Glaukomformen	3
1.1.3 Früherkennung, Diagnostik und typische Befunde beim Glaukom	5
1.2 Elektrophysiologische Untersuchungen	7
1.2.1 Visuell Evozierte Potentiale	7
1.2.2 Elektroretinogramm	9
1.3 Autoimmune Komponente beim Glaukom	10
1.3.1 Immunsystem und Autoimmunität	10
1.3.2 Hinweise auf eine Beteiligung des Immunsystems an der Pathogenese des Glaukoms	12
1.3.3 Immunprivileg des Auges	14
1.4 Versuchsansatz	15
1.4.1 Tiermodell: Experimentelles Autoimmun Glaukom Modell	15
1.4.2 Visuell evozierte Potentiale am Experimentellen Autoimmun Glaukom Modell	16
2. Ziel der Untersuchung	18
3. Material	19
4. Methoden	21
4.1 Studiendesign	21
4.2 Versuchstiere	22
4.3 Immunisierung	23
4.4 Herstellung des Sehnerv-Homogenats	23
4.5 Augeninnendruckmessung	24
4.6 Funduskopie	25
4.7 Messung visuell evozierter Potentiale	27
4.7.1 Implantation der Elektroden	27

4.7.2	Ableitung der visuell evozierten Potentiale	30
4.8	Blutentnahmen	33
4.8.1	Schwanzvenenblutentnahme	33
4.8.2	Herzpunktion	34
4.9	Kammerwasserentnahme	35
4.10	Organentnahmen	35
4.10.1	Herstellung der Fixierungslösungen	35
4.10.2	Augen- und Sehnerv-Entnahme	36
4.10.2	Gehirnentnahme	36
4.11	Untersuchung der entnommenen Gehirne	37
4.11.1	Paraffineinbettung	37
4.11.2	Paraffinschnitte	37
4.11.3	Färbung der Schnitte	37
4.11.4	Mikroskopische Beurteilung der Gehirnschnitte	38
4.12	Statistische Verfahren	38
5.	Ergebnisse	40
5.1	Studienablauf und Versuchstiere	40
5.2	Augeninnendruck	40
5.3	Fundusuntersuchung	43
5.4	Visuell evozierte Potentiale	44
5.4.1	Allgemeines	44
5.4.2	Transiente visuell evozierte Potentiale	45
5.4.2.1	Latenzzeiten in der On-Phase	46
5.4.2.2	Latenzzeiten in der Off-Phase	48
5.4.2.3	Amplituden in On- und Off-Phase	49
5.4.3	Stationäre visuell evozierte Potentiale	50
5.4.3.1	Wert S (Steigung)	50
5.4.3.2	Wert TR (Temporale Antworten)	54
5.4.4	Zusammenfassung zu den visuell evozierten Potentialen	56
5.5	Blutentnahmen und Kammerwasserentnahme	57
5.6	Augen- und Sehnerv-Entnahme	57
5.7	Gehirnentnahme und histologische Untersuchung	58

6.	Diskussion	60
6.1	Das Experimentelle Autoimmun Glaukom Modell im Vergleich mit dem Glaukom	60
6.2	Augeninnendruck	60
6.3	Fundusuntersuchung	62
6.4	Visuell evozierte Potentiale	63
6.4.1	Bewertung der Latenzzeiten	64
6.4.2	Beurteilung der Amplitudenhöhe	65
6.4.3	Bewertung des Kontrastsehens	67
6.4.4	Vorschläge zur Erweiterung der Methode	68
6.4.5	Elektroretinogramme als alternatives elektrophysiologisches Verfahren	70
6.5	Myelin basisches Protein-Gruppe	71
6.5.1	Histologische Gehirnuntersuchung	71
6.5.2	Hypothesen zum Pathomechanismus bei Immunisierung mit Myelin basischem Protein	72
6.6	Hypothesen zum Pathomechanismus bei Immunisierung mit Glia fibrillärem saurem und Sehnerv-Homogenat	74
6.7	Ursprung der Antikörper	75
6.8	Ausblick	77
7.	Zusammenfassung	80
8.	Literaturverzeichnis	82
9.	Anhang	100

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACAID	Vorderkammer assoziierte Immunverschiebung
Ag	Antigen
AK	Antikörper
ANOVA	Varianzanalyse
AP	Ausgangspunkt
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Bluthirnschranke
BRS	Blutretinaschranke
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Unterscheidungsgruppen
cd/m ³	Candela/Kubikmeter
CGL	Corpus geniculatum laterale
cm	Zentimeter
Da	Dalton
d.h.	das heißt
Dr.	Doktor
EAE	Experimentelle Autoimmun Enzephalitis
EAG	Experimentelles Autoimmun Glaukom
EAU	Experimentelle Autoimmun Uveitis
EEG	Elektroenzephalogramm
EON	Experimentelle Optikus Neuritis
ERG	Elektroretinogramm
EUGS	Europäische Glaukom Gesellschaft
FA	Freunds Adjuvant
FRP	Frühes Rezeptorpotential
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykan
GFAP	Glia fibrilläres saures Protein
h	Stunde
HLA	Humanes Leukozyten Antigen System

HSD	signifikant verschieden
HSP	Hitzeschockprotein
Hz	Hertz
IgA	Immunglobulin A
IgD	Immunglobulin D
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IOD	Intraokulärer Druck
kDA	Kilo Dalton
KO	Kontrollgruppe
lat.	lateinisch
MBP	Myelin basisches Protein
MERG	Muster-Elektroretinogramm
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
n	Stichprobenzahl
nm	Nanometer
NTG	Normaldruckglaukom
OCT	Okuläre Kohärenz Tomographie
OHT	Okuläre Hypertension
OP	Operation
PANDAS	autoimmune neuropsychiatrische Kinderkrankheit assoziiert mit Streptokokkeninfekt
PBS	Phosphat gepufferte Saline
P.D.	Privatdozent
PEX	Pseudoexfoliation
PLP	Proteolipid-Protein
POAG	Primäres Offenwinkelglaukom
Prof.	Professor

PT	Pertussistoxin
RGC	Retinale Ganglienzellen
s	Sekunde
S	Steigung
SEM	Standardfehler
SD	Standardabweichung
SN	Sehnerv-Gruppe
Tab.	Tabelle
TR	Temporale Antworten
u.a.	und andere
VEP	Visuell evozierte Potentiale
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µV	Mikrovolt
2W	Zeitpunkt zwei Wochen nach Immunisierung
4W	Zeitpunkt vier Wochen nach Immunisierung

1. Einleitung

1.1 Grundlagen zum Glaukom

1.1.1 Ätiologie und Pathogenese des Glaukoms

Die Gruppe der Glaukomerkrankungen ist die zweithäufigste Ursache irreversibler Erblindung weltweit (Quigley, 1996). Im Jahre 2020 werden circa 80 Millionen Menschen weltweit an einem Glaukom erkrankt sein (Quigley und Broman, 2006). Die Prävalenz bei Patienten über 40 Jahre beträgt 0,5 bis 2 % (Pfeiffer, 2001). Die Häufigkeit nimmt im Alter fast exponentiell zu. Etwa 5 % der 75-jährigen sind von dieser Erkrankung betroffen (Klein et al., 1992). Immer noch bleibt bei Vielen ein Glaukom unerkannt. Selbst in den Industrieländern wird diese Dunkelziffer auf 50 % geschätzt (Pfeiffer, 2001).

Ätiologie und Pathogenese der Gruppe der Augenerkrankungen, die unter dem Begriff Glaukom zusammengefasst werden, sind bisher noch wenig verstanden. Diskutiert werden momentan verschiedene Ansätze, die in ergänzender Form aufeinander einwirken könnten. Durch die Europäische Glaukom Gesellschaft (EUGS) entstand 2003 eine neue bis heute gültige Definition des Glaukoms. So wird unter diesem Namen eine heterogene Gruppe von Augenerkrankungen mit progredienter und irreversibler Schädigung der retinalen Ganglienzellen bei zunehmendem Verlust der visuellen Funktion in einem typischen Verlauf zusammengefasst. Einhergehend zeigen sich morphologische Veränderungen des Sehnervenkopfes (Papille) und physiologische Veränderungen der retinalen Schichten (EUGS, 2003).

Jahrelang wurden in erster Linie der erhöhte Augeninnendruck und die daraus folgende Druckschädigung als Ursachen für die Glaukomentstehung gesehen. Aber nur ca. 2/3 bis 3/4 der Glaukompatienten haben einen Augeninnendruck über 21 mmHg (Bonomi et al., 2001; Sommer et al., 1991). Beinahe 30 % der Glaukompatienten entwickeln nie einen erhöhten Augeninnendruck und haben trotzdem ein fortschreitendes Glaukom (Quigley, 1993). Fakt bleibt jedoch, dass der erhöhte Augeninnendruck einer der wichtigsten Risikofaktoren für eine Glaukomerkrankung ist (Sommer et al., 1991). Der Druck kann zu einer Deformierung der Lamina cribrosa führen, wodurch es zu einer Verletzung der Axone kommen kann, in dem die den Sehnerven bildenden Nervenfasern bei ihrem Austritt

aus dem Auge an der Papille abgeknickt und so geschädigt werden (Quigley, 1999; Yan et.al., 1994).

Weitere gesicherte Risikofaktoren für die Ausbildung eines Glaukoms, sind fortgeschrittenes Lebensalter, schwarze Hautfarbe und eine positive Familienanamnese (Sommer et al., 1991). Weiterhin werden eine ausgeprägte Myopie, erhöhter Blutdruck mit kardiovaskulären Erkrankungen oder erniedrigter Blutdruck mit Vasospasmen, andere rheologische Parameter, Steroideinnahme, Migräne und das Schlaf-Apnoe-Syndrom als Risikofaktoren diskutiert (Tetz und Schwenn, 2007a).

Ein anderer möglicher Mechanismus ist die Ischämieschädigung (Harju und Vesti, 2001; Michelson et al., 1998). Abhängig vom Perfusionsdruck, der als Differenz aus Blutdruck und intraokularem Druck definiert ist, kann ein erhöhter Augeninnendruck zu einer Mikrozirkulationsstörung im Sehnerv führen. Ist die Versorgung der Nervenfasern dann nicht mehr gewährleistet, kann es zu einem Schaden kommen. Dieses Modell gilt bisher auch als Erklärung für die Schädigung bei Patienten ohne erhöhten Augeninnendruck. Die okuläre und cerebrale Durchblutung scheint, insbesondere bei Patienten mit Normaldruckglaukom, vermindert (Sugiyama et al., 2006). Zusätzlich wird vermutet, dass diese vaskuläre Komponente mit Minderdurchblutung des Sehnervs bei dieser Patientengruppe noch durch einen niedrigen Blutdruck (Emre et al., 2004) oder ein vasospastisches Syndrom, also eine Störung der Gefäßregulation (Pache et al., 2003), verstärkt wird. Außerdem ist in diesem Zusammenhang auch von einem Reperfusionsschaden auszugehen, der bei stark wechselnden und nicht bedarfgerechten Druckverhältnissen auftritt (Flammer et al., 2002). Beim Reperfusionsschaden werden nach dem Wiedereinstrom von Blut in die vorher minderperfundierte Areale freie Radikale gebildet, die sowohl für die retinale Ganglienzelle, als auch für die umgebenden Gliazellen schädlich sind. Die Gliazellen selbst sind zwar gegen Hypoxie vergleichsweise resistent, sind aber gegenüber freien Radikalen sehr empfindlich (Osborne et al., 2001). Dabei kann die Regulation des extrazellulären Milieus, insbesondere die Aufnahme von Glutamat durch die Gliazellen, nicht mehr bewerkstelligt werden.

Zudem führt die Ischämie durch dabei entstehenden oxidativen Stress zur intrazellulären Schädigung der retinalen Ganglienzelle (Tezel, 2006). Durch bei der Reperfusion entstehende freie Sauerstoffradikale (Nguyen et al., 2003), erhöhte Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen (Tezel et al., 2000; Tezel et al., 2004), überschüssige exzitatorische Neurotransmitter wie Glutamat (Dreyer et al.,

1996; Vorwerk et al., 1999) und hohen Calcium-Ionen Einstrom (Sappington und Calkins, 2008; Sappington et al., 2008) kann es zur Apoptose von retinalen Ganglienzellen und amakrinen Zellen kommen (Haeflinger et al., 2000).

Die Gliazellen scheinen dabei eine paradoxe Rolle zu spielen. Eigentlich sollen sie die retinalen Ganglienzellen und die Axone des Sehnervs vor äußeren Einflüssen schützen. Doch nach ihrer Aktivierung bei glaukomatösem Stress scheinen sie nicht nur protektive, sondern auch destruktive Funktionen zu haben (Johnson und Morrison, 2009; Tezel et al., 2009)

Aktuell werden verschiedene neue Theorien zur Pathogenese des Glaukoms diskutiert. So gehen einige Autoren davon aus, dass eine altersabhängige mitochondriale Dysfunktion eine zentrale Rolle spielen könnte (Kong et al., 2009). Mitochondrien sind die Energielieferanten der Zelle, da sie Adenosintriphosphat (ATP) bereitstellen, und sie regulieren den Zelltod durch Apoptose. Die retinalen Ganglienzellen könnten durch eine eingeschränkte Funktion dieser Zellorganellen, empfindlicher für glaukomatösen Stress sein, weil die Energiebereitstellung zu gering für Reparaturmechanismen ist und deshalb Apoptose eingeleitet wird (Tezel et al., 2009). Mitochondriale Dysfunktion scheint auch in anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Amyotrophe Lateralsklerose, Alzheimer und Parkinson an der Pathogenese beteiligt zu sein (Leuner et al., 2007; Martin, 2006).

Eingedenk der Tatsache, dass in der Vergangenheit Autoimmunität als fester Bestandteil neurodegenerativer Erkrankungen, wie beispielsweise der Myasthenia gravis (Graus and De Baets, 1993), ausgemacht wurde, konnten verschiedene Arbeitsgruppen in den letzten Jahren Hinweise für eine autoimmune Komponente auch in der Glaukompathogenese finden, die an anderer Stelle dieser Arbeit detailliert behandelt werden.

1.1.2 Glaukomformen

Primäre Glaukome

Primäres Offenwinkelglaukom (POAG)

Das Primäre Offenwinkelglaukom ist mit 60 bis 90 % unter allen Glaukomformen das in Europa am häufigsten vertretene (Pfeiffer, 2001). Es ist durch einen erhöhten Augeninnendruck, bei offenem Kammerwinkel und Obstruktion des Kammerwasserabflusses in Trabekelwerk und Schlemm-Kanal gekennzeichnet (Sommer et. al., 1991). In diesen Bereichen kommt es zu einer vermehrten

Ablagerung extrazellulären Materials in Form von Plaques, die für die Abflussbehinderung verantwortlich sein könnten (Rohen et al., 1993). Typisch ist ein symptomarmer Erkrankungsbeginn mit einem chronisch-protrahierten Erkrankungsverlauf. Das beidseitige Erblindungsrisiko liegt bei circa 10 % (Pfeiffer, 2001).

Normaldruckglaukom (NTG)

In Europa und in den Vereinigten Staaten von Amerika liegt der Anteil des Normaldruckglaukoms an der Gesamtheit aller Glaukomformen bei 35 %, während es in Japan mit 50 bis 70 % deutlich häufiger vertreten ist (Pfeiffer, 2001). Mit Ausnahme des erhöhten Augeninnendrucks treffen sonst sämtliche Kriterien des primären Offenwinkelglaukoms zu. Papillenrandblutungen gehören zu den prognostisch ungünstigen Faktoren beim Normaldruckglaukom (Ishida et al., 2000).

Primäre/Sekundäre Winkelblockglaukome

Winkelblockglaukome sind mit 5 % eher selten vertreten (Pfeiffer, 2001). Risikofaktoren sind zum Beispiel Hypermetropie mit flacher Vorderkammer und eine dicke, weit vorne liegende Linse. Man unterscheidet eine akute Form, die man auch als Glaukomanfall bezeichnet, der als Notfall sofortiger Therapie bedarf, von einer chronischen Form. Die sekundären Formen sind oft Folge intraokulärer Entzündung mit Ausbildung von Synechien, die den Kammerwinkel blockieren.

Kongenitale Glaukome

Die Häufigkeit einer solchen Erkrankung liegt bei 1 auf 20.000 Geburten. Meist liegt sie bilateral vor und manifestiert sich im ersten Lebensjahr (Tetz und Schwenn, 2007). Der Abfluss des Kammerwassers wird durch persistierendes embryonales Gewebe blockiert. Die Leitsymptome sind ein Buphthalmus, eine Epiphora, und verstärkte Blendempfindlichkeit. Wird die Erkrankung nicht frühzeitig erkannt und operativ behandelt, kann es zu schwerwiegenden Folgen und Erblindung kommen.

Sekundäre Glaukome

Pseudoexfoliationsglaukom

Es macht unter den sekundären Glaukomen einen Anteil von 5 bis 50 % aus (Pfeiffer, 2001). Charakteristisch sind die Pseudoexfoliations-Fibrillen. Diese werden in Strukturen des vorderen Augensegmentes abgelagert und erhöhen somit den Abflusswiderstand des Kammerwassers. Der Verlauf gestaltet sich meist sehr rasch progredient.

Okuläre Hypertension (OHT)

Die okuläre Hypertension gehört nicht zur Gruppe der Glaukomerkrankungen, wird an dieser Stelle aber zur Abgrenzung ebenfalls besprochen. Zwischen 4 und 7 % der deutschen Population über 40 Jahre hat eine diagnostizierte okuläre Hypertension (Tetz und Schwenn, 2007). Von einer okulären Hypertension spricht man, wenn ein erhöhter Augeninnendruck nicht mit den für das Glaukom typischen Papillenbefunden und Gesichtsfeldschäden einhergeht. In der „Ocular Hypertension Treatment Study“ wurde gezeigt, dass in einem Zeitraum von 5 Jahren circa 10 % der Patienten mit okulärer Hypertension ein Glaukom entwickeln (Gordon et al., 2002; Pfeiffer, 2005).

1.1.3 Früherkennung, Diagnostik und typische Befunde beim Glaukom

Zur Früherkennung eignen sich Untersuchungen, die eine Erkrankung kostengünstig und gefahrlos mit hoher Sensitivität und Spezifität nachweisen. Beim Glaukom sind diese Früherkennungsuntersuchungen vom Augenarzt durchzuführen. Durch diese Untersuchungen soll die Erkrankung frühzeitig erkannt und behandelt werden. Beim Glaukom kann das Erblindungsrisiko durch eine konsequente und rechtzeitig eingeleitete Therapie um die Hälfte gesenkt werden (Pfeiffer, 2001). Allerdings ist davon auszugehen, dass das Glaukom klinisch erst zehn Jahre nach seinem Beginn auffällig und diagnostizierbar wird (Pfeiffer, 2001). Eine Methode, die dieses Intervall deutlich verkürzt, wäre wünschenswert.

Auf die verschiedenen diagnostischen Verfahren und ihre beim Glaukom typischen Befunde soll an dieser Stelle kurz eingegangen werden.

Tonometrie (Augeninnendruckmessung)

Für die Tonometrie gibt es verschiedene nicht-invasive Verfahren, die mit einer Genauigkeit von circa 1 mmHg messen. Der physiologische Augeninnendruck liegt in den Grenzen zwischen 10 und 20 mmHg, wobei es physiologische Schwankungen je nach Alter und Tageszeit gibt (Grehn, 2007a). Eine einmalige Druckmessung ermöglicht deshalb meist noch keine Diagnose. Dafür müssen Messungen wiederholt und in regelmäßigen Abständen durchgeführt werden, eventuell wird auch ein Tagesdruckprofil mit Nachtmessungen notwendig. Meistens ist der Augeninnendruck morgens am höchsten, doch gerade Glaukompatienten haben Druckspitzen auch nachts oder zu anderen Tageszeiten (Sit und Liu, 2009). Die Messung des

Augeninnendruck alleine hat als Glaukomsuchtest wenig Aussagekraft (Detry-Morel et al., 2004).

Ophthalmoskopie / Funduskopie

Man unterscheidet zwei verschiedene Verfahren. Die direkte Ophthalmoskopie, das Augenspiegeln im aufrechten Bild, und die indirekte Ophthalmoskopie, das Augenspiegeln im umgekehrten Bild.

Beide Untersuchungsmethoden sind am einfachsten durchführbar, wenn die Pupille des Patienten erweitert und der Untersuchungsraum abgedunkelt ist.

Der typische Befund bei Glaukom zeigt eine große, hochovale Exkavation als Zeichen der parapapillären chorioretinalen Atrophie. Dies steht im Gegensatz zur physiologischen Form der Papille, die eher klein und queroval ist. Um die Größe der Papillenexkavation objektiv zu bestimmen, kann man die Cup-Disc-Ratio berechnen, bei der man die Exkavation mit dem Durchmesser der Papille ins Verhältnis setzt. Werte unter 0,3 sind normal, ab 0,7 sind die Werte stark verdächtig für glaukomatöse Veränderungen. Kerbenbildung, streifenförmige Blutungen und ein Abknicken der Gefäße am Papillenrand sind weitere typische Befunde (Grehn, 2007b).

Wichtig ist es auch die Befunde photographisch zu dokumentieren, um sie mit Ausgangsaufnahmen und Verlaufsaufnahmen vergleichbar und somit ein Fortschreiten der Erkrankung erkennbar zu machen.

Spaltlampenuntersuchung

Die Vorrichtung zur Spaltlampenuntersuchung besteht aus einem horizontal gestellten Mikroskop und einer seitlich ausschwenkbaren Beleuchtungseinrichtung, die ein spaltförmiges Lichtbündel produziert. Dieser Lichtspalt legt einen optischen Schnitt durch transparentes Augengewebe. Variiert man ihn in seiner Breite und lässt ihn aus unterschiedlichen Winkeln einfallen, kann man sich eine gute Übersicht über alle brechenden Strukturen des Auges verschaffen.

Gonioskopie

Die Gonioskopie dient der Beurteilung des Kammerwinkels. Nach einer Lokalanästhesie mittels Augentropfen wird ein Drei-Spiegel-Glas nach Goldmann auf die Augenoberfläche aufgesetzt. Das Licht der Spaltlampe kann nun derart umgelenkt werden, dass die Strukturen des Kammerwinkels beurteilt werden können. Zum einen wird entschieden, ob der Kammerwinkel offen oder geschlossen ist, zum anderen, ob spezifische Ablagerungen gefunden werden.

Perimetrie

Die kinetische, mechanisch durchgeführte Perimetrie und die statische, meist automatische oder computergesteuerte Perimetrie dienen der Beurteilung des Gesichtsfeldes. Das Gesichtsfeld ist der Bezirk der Außenwelt, den man bei ruhig gestelltem Auge, wahrnimmt. Ausfälle des Gesichtsfeldes bezeichnet man als Skotome (griechisch = Schatten), wobei absolute von relativen Skotomen unterschieden werden. Gesichtsfeldausfälle zeigen sich erst, wenn mehr als 30 % der Nervenfasern Schaden genommen haben (Grehn, 2007a).

Beim Glaukom gibt es einen typischen Verlauf des Gesichtsfeldausfalls. Zuerst treten kleine parazentrale Skotome auf, bei denen die Sehschärfe nicht direkt beeinträchtigt. Die parazentralen Skotome fließen langsam zu einem größeren Defekt zusammen, der mit dem blinden Fleck in Verbindung steht und nach seinem Beschreiber als Bjerrum Skotom bezeichnet. Schließlich wird das Gesichtsfeld eingeengt, zunächst von nasal bis nahe an das Zentrum heran, danach von temporal (Hart und Becker, 1982). Die Netzhautmitte und damit das zentrale Sehen bleiben meist lange erhalten. Erst in einem sehr fortgeschrittenen Stadium, wenn das zentrale Sehen betroffen ist, bemerkt der Patient seinen Sehfunktionsverlust.

Elektrophysiologische Untersuchungen

Zu den elektrophysiologischen Untersuchungen zählen zum Beispiel die visuell evozierten Potentiale und die Elektroretinogramme. Auf Grund ihrer besonderen Bedeutung in dieser Arbeit werden diese Untersuchungen im nächsten Kapitel detailliert besprochen.

1.2 Elektrophysiologische Untersuchungen

1.2.1 Visuell evozierte Potentiale

Visuell evozierte Potentiale erlauben eine Funktionsprüfung des optischen Systems zwischen Retina und Sehrinde und können durch krankhafte Prozesse an beliebiger Stelle der Sehbahn eine Veränderung erfahren. Mit Abstand am wichtigsten sind die visuell evozierten Potentiale zur Diagnostik von Erkrankungen des Sehnervs, wobei die spezifischsten Befunde bei Sehnervenentzündungen erhoben werden (Vogel, 2006).

Man unterscheidet in Abhängigkeit von der Reizdarbietung blitzevozierte Potentiale und Potentiale nach Musterumkehrstimulation. Erstere lassen eine zeitliche Charakteristik der visuellen Informationsverarbeitung zu. Sie sind weniger

empfindlich gegenüber Einflussgrößen wie Pupillenweite, Aufmerksamkeit, Lampenabstand und Augenbewegungen. Deshalb sind sie auch bei komatösen, narkotisierten Patienten oder bei fehlender Mitarbeit durchführbar (Stöhr et al., 2005). Ihr Nachteil ist, dass die evozierte Antwort ein Gemisch aus der Reaktion auf die globale Beleuchtungsänderung und die Struktur des Reizes ist. Auch wenn sie intra-individuell ziemlich konstant sind, so sind sie inter-individuell in Form und Latenz doch sehr variabel. Die Potentiale sind also schwächer und weniger gut reproduzierbar und die Standardabweichungen der Mittelwerte sind erheblich größer als bei Schachbrettmuster-VEPs (Halliday, 1976). Die Trennung zwischen „gesund“ und „krank“ ist somit schwieriger zu vollziehen. Die Musterumkehrstimulation hat dagegen den Vorteil, dass die mittlere Leuchtdichte konstant bleibt und nur Änderungen der Bildstruktur erfolgen. Sie geben also Aufschluss über die Mustererkennung und Musterverarbeitung, sind aber von der Mitarbeit und Aufmerksamkeit des Patienten und von der richtigen Refraktion maßgeblich abhängig (Stöhr et al., 2005).

In Abhängigkeit von der Variation der zeitlichen Aufeinanderfolge der visuellen Reize, also der Reizkonfiguration, unterscheidet man zwei verschiedenen Arten von visuell evozierten Potentialen, nämlich transiente und stationäre (Celesia und Brigell, 1999). Transiente Potentiale messen eine reizgekoppelte Einzelantwort. Es erfolgt eine wiederholte Reizdarbietung desselben Stimulus mit einer Frequenz zwischen 0,5 und 2 Hertz. Das optische System kann so in den Reizpausen zur Ruhe kommen. Zur Registrierung ist aber immer ein repetitives Messverfahren mit einer Mittelung der erhaltenen Amplituden notwendig. In der Praxis werden sie bevorzugt verwendet und haben auch die größere Bedeutung.

Bei stationären Potentialen erfolgt eine kontinuierliche Darbietung eines sinusförmigen Reizes. Die Frequenz des Antwortpotentials entspricht der Reizfrequenz der Lichtquelle. Diese Reizfrequenz liegt bei circa 8 bis 9 Hertz. Somit entstehen auch sinusförmige Potentialschwankungen. Es können besonders Fehlfunktionen der Bewegungsafferenzen aufgedeckt werden.

Des Weiteren kann man anhand der unterschiedlichen Größe des Reizfeldes verschiedene Formen von visuell evozierten Potentialen unterscheiden. Bei der Ganzfeldreizung werden beide Gesichtshälften mit einer Reizgröße von mehr als zwölf Sehwinkelgraden gereizt. Bei der Halbfeldreizung findet eine getrennte Stimulation von nasalen und temporalen Retinahälften statt. Bei der fovealen Reizung ist der Reiz maximal drei Sehwinkelgraden groß (Stöhr et al., 2005).

Bei evozierten Potentialen sind die wichtigsten Messgrößen zur Auswertung die Latenz, also die Geschwindigkeit der Reizweiterleitung, die Amplitude und die Form der Reizantwort.

Eine verlängerte Latenzzeit zeigt Schäden im Sehnerv oder der Sehbahn an, zum Beispiel hervorgerufen durch eine Demyelinisierung des Nervus opticus.

Normale Amplituden von visuell evozierten Potentialen sind bei einem Visus größer 0,3 zu erwarten (Maurer et al., 2005).

Mittels visuell evozierter Potentiale kann man demyelinisierende von axonalen Prozessen unterscheiden. Bei den demyelinisierenden Erkrankungen steht eine deutliche Latenzverminderung im Vordergrund. Des Weiteren kann es einen partiellen oder totalen Leitungsblock mit Potentialausfall oder Amplitudenverminderung geben. Auch Formveränderungen können auftreten. Axonale Prozesse sind durch Amplitudenverminderung, Formveränderungen und nur leichte Latenzverzögerungen gekennzeichnet (Maurer et al., 2005).

Bei Glaukompatienten können Untersuchungen von Kontrast-, Bewegungs- und Flickerwahrnehmung eventuell zur Frühdiagnose herangezogen werden, denn diese Funktionen sind oft schon gestört, bevor Gesichtsfeldausfälle eintreten. Allerdings sind diese Untersuchungen zum einen sehr zeitaufwendig und somit auch kostenintensiv und zum anderen ist ihre Durchführung kompliziert und die Schwankung der Werte bisher relativ groß. Deshalb sind sie zur Routine noch nicht geeignet (Grehn, 2007a).

Bis dato spielen visuell evozierte Potentiale eine wichtige Rolle bei der Diagnose der Retrobulbärneuritis im Rahmen der Multiplen Sklerose, bei anderen Sehnervenentzündungen, bei der Differenzierung von Papillenveränderungen, bei raumfordernden Prozessen und bei toxischen Optikusschäden (Vogel, 2006).

1.2.2 Elektroretinogramm

Das Elektroretinogramm misst Potentialveränderungen, also elektrische Reaktionen, der Netzhaut als Folge auf visuelle Reize.

Zur Durchführung eines Elektroretinogramms trägt der Patient während der Untersuchung eine Kontaktlinse, in die eine Ringelektrode eingebracht ist, und eine indifferente Elektrode auf der Haut. Es erfolgt somit eine nicht-invasive Ableitung von der Kornea gegen eine frontale Referenzelektrode, während dem Patienten visuelle Reize dargeboten werden.

Man unterscheidet zwei Grundtypen von Elektroretinogrammen (Stöhr et al., 2005).

1. Helligkeits-Elektroretinogramm

Beim Helligkeits-ERG wird ein Summenaktionspotential durch Ionenverschiebung bei Belichtung gemessen. Die Untersuchung kann dunkel- und helladaptiert erfolgen. Bei der ersten Methode richtet sich die Untersuchung mehr an die Stäbchen, bei der zweiten Variante mehr an die Zapfen. Man kann ein frühes Rezeptorpotential (FRP), das die Potentialschwankung der Rezeptormembran darstellt, von einem späten negativen Rezeptorpotential unterscheiden. Dieses bezeichnet man auch als A-Welle, die Ausdruck des Aktionspotentials der Photorezeptoren ist. Oft ist eine Unterscheidung in A1-Welle für die Zapfen und A2-Welle für die Stäbchen möglich. Danach folgen die positive B-Welle, die das Aktionspotential der Bipolaren und der Müller Gliazellen darstellt, und die C-Welle, die das Aktionspotential des Pigmentepithels wiedergibt. Zwischen der B- und der C-Welle lassen sich manchmal auch noch Oszillatorische Potentiale aus den amakrinen Zellen erkennen.

2. Muster-Elektroretinogramm

Beim Muster-ERG werden dem Patienten als visuelle Reize Schachbrettmuster mit 16 Wechseln pro Sekunde gezeigt. Es gibt am besten das Aktionspotential der Ganglienzellen wieder.

Durch die beschriebene Wellenform des Elektroretinogramms besteht die Möglichkeit lokale Störungen der Netzhautfunktion topographisch zuzuordnen (Stöhr et al., 2005). Liegt zum Beispiel eine Atrophie des Sehnervs vor, dann zeigt sich ein herabgesetztes oder sogar erloschenes Muster-ERG, während das Helligkeits-ERG in seiner Form unverändert sein kann. Eine Kombination aus Muster-Elektroretinogramm und visuell evozierten Potentialen erlaubt die elektrophysiologische Differenzierung zwischen Erkrankungen der Netzhaut und Erkrankungen der Sehbahn.

1.3 Autoimmune Komponente beim Glaukom

1.3.1 Immunsystem und Autoimmunität

Als immunologische Toleranz bezeichnet man die Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen Selbst und Nichtselbst, also körpereigen und körperfremd (Ansorge, 2007). Diese wird nach der Geburt erworben. Man unterscheidet dabei zentrale und periphere Toleranz. Bei der zentralen Toleranz ist das wichtigste beteiligte Organ der Thymus. Durch intrathymische T-Zellreifung kommt es zur negativen Selektion

autoreaktiver T-Lymphozyten. Bei der peripheren Toleranz vermindern regulatorische T-Zellen durch Zytokine die Aktivität autoreaktiver T-Lymphozyten (Ansorge, 2007). Autoimmunität ist eine normale Eigenschaft des Körpers. Jeder gesunde Organismus hat eine geringe Zahl von Antikörpern, B- und T-Zellen, die spezifisch gegen körpereigene Antigene reagieren (Roitt et al., 1991). Doch die periphere Toleranz beugt schädlichen Reaktionen vor. So können Auto-Antikörper ohne Krankheitswert beim Gesunden vorkommen (Kohler et al., 2003). Dieses Antikörper-Muster wird in den ersten 2 bis 4 Lebensjahren ausgebildet (Lacrois-Desmazes et al., 1998). Die natürliche Autoimmunität ist beim Gesunden weitgehend konstant (Nobrega et al., 1993) und wird deshalb auch als immunologischer Homunkulus bezeichnet (Mouthon et al., 1995). Kommt es zum Bruch der zentralen und peripheren immunologischen Toleranz entstehen Autoimmunerkrankungen (Ansorge, 2007). 5 % der Bevölkerung in Industrieländern sind von einer Autoimmunerkrankung betroffen (Renz-Polster et al., 2008). Autoimmunerkrankungen zeichnen sich durch eine Aktivierung von B- und T-Zellen ohne unmittelbaren Auslöser aus. Diese Immunantwort führt dann zur Zerstörung eines oder mehrerer Körpergewebe.

Schwankungen im Antikörperprofil von Patienten mit signifikantem Unterschied zum Gesunden zeigen sich bei Erkrankungen wie Myasthenia gravis (Zimmermann und Weiss, 1987), endokrine Orbitopathie (Grus et al., 1997 a; Zimmermann et al., 1989), Sydenham Chorea (Singer et al., 2003), Guillan-Barre Syndrom (Dziewas et al., 2001), Tourette Syndrom (Wendlandt et al., 2001) und PANDAS (Singer et al., 2004). Bei Multiple Sklerose, Diabetes mellitus Typ I, Vaskulitiden und anderen rheumatologischen Erkrankungen ist ein vermehrtes Auftreten von ganz bestimmten Auto-Antikörpern nachgewiesen (Renz-Polster et al., 2008). Bei der Myasthenia gravis wurden Antikörper gegen den muskulären Acetylcholin-Rezeptor gefunden (Graus und De Baets, 1993; Hughes et al., 2004). Allerdings gibt es auch erkrankte Patienten ohne nachweisbare Antikörper (Vincent et al., 2004). Bei der Sklerodermie zeigen sich häufig erhöhte Anti-Fibrillin- und Anti-Matrixmetalloproteinase-Antikörper (Chung und Utz, 2004). Antikörper gegen citrullinierte Proteine findet man bei der rheumatoiden Arthritis (Hueber et al., 2003; Nijenhuis et al., 2004). Im Serum von Patienten mit Multipler Sklerose findet man Antikörper gegen retinale Strukturen, wie zum Beispiel retinales Arrestin (Gorczyca et al., 2004).

Oft sind diese Erkrankungen auch mit bestimmten HLA-Allelen assoziiert. Das HLA-System ist das spezifische MHC-System. Es codiert Membranproteine, die die Basis der Diskriminierung von Selbst und Nicht-Selbst durch die T-Lymphozyten bilden.

Individuelle HLA-Haplotypen zeigen Assoziationen zu bestimmten Erkrankungen, insbesondere Autoimmunerkrankungen. So wird HLA-B 27 oft bei rheumatischen Erkrankungen nachgewiesen, besonders häufig beim Morbus Bechterew. HLA-DR 4 wird bei rheumatoider Arthritis, beim Lupus erythematodes, bei Diabetes mellitus Typ I und beim Pemphigus vulgaris häufig gefunden (Classen et al., 2004).

Die Pathogenese solcher Erkrankungen ist bisher schlecht verstanden und Mittelpunkt vieler Forschungsarbeiten. Man vermutet, dass die Entstehung einer Autoimmunerkrankung nicht nur eine Ursache hat, sondern verschiedene Bedingungen erfüllt sein müssen, bis es zu einer Erkrankung kommt. Eine wichtige Rolle kommt dabei der genetischen Disposition zu (Roitt et al., 1991). Häufig scheint auch ein äußerer Anlass, wie zum Beispiel ein Virusinfekt, Grund für die Entstehung einer Erkrankung zu sein. Erklärung dafür könnte die Ähnlichkeit zwischen einem Fremd-Antigen und einem körpereigenen Antigen sein, wodurch es in der Folge zu Kreuzreaktionen kommt. Einen solchen Vorgang bezeichnet man als Molekulares Mimikry (Oldstone, 2005). Als besonders klassisches Beispiel gilt in diesem Zusammenhang das rheumatische Fieber, bei dem es zu einer Kreuzreaktion zwischen dem M-Protein der Streptokokken als Fremd-Antigen und dem Myosin des Sarkolemmes der Herzmuskelzellen als Selbst-Antigen kommt (Classen et al., 2004).

1.3.2 Hinweise auf eine Beteiligung des Immunsystems an der Pathogenese Glaukoms

Als klassische Zeichen für eine Autoimmunerkrankung gelten ein erhöhter Titer eines oder mehrerer Auto-Antikörper, Komplementerniedrigung, bedingt durch vermehrten Komplementverbrauch, histologische Veränderungen, wie Ablagerungen von Auto-Antikörper, Immunkomplexen oder Komplement, und sekundäre Immundefekte, die sich in einer erhöhten Infektanfälligkeit zeigen (Renz-Polster et al., 2008). Einige solcher Veränderungen sind im Zusammenhang mit dem Glaukom in den letzten Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen worden.

Durch Professor Wax und seine Mitarbeiter haben sich erstmals vor circa fünfzehn Jahren Hinweise auf eine mögliche immunologische Komponente in der Pathogenese des Glaukoms ergeben. Bei Normaldruckglaukompatienten wurde eine erhöhte Inzidenz für Paraproteinämie und Auto-Antikörper nachgewiesen (Wax et al., 1994). Außerdem wurde eine erhöhte Antikörperreaktivität gegen okuläre Strukturen bei Patienten mit Normaldruckglaukom festgestellt, z.B. gegen verschiedene

Sehnerv- (Tezel, et al., 1999) und Retina-Antigene (Romano et al., 1999; Tezel et al., 1998; Wax et al., 1998a, 2001). In den letzten Jahren konnten von verschiedenen Gruppen unterschiedliche Antikörper gefunden werden, die bei Glaukompatienten erhöht sind, z.B. Antikörper gegen Hitzeschockprotein 60 (Wax et al., 1998a), Antikörper gegen kleine Hitzeschockproteine (HSPs) wie Alpha A-Crystallin, Alpha B-Crystallin, Hitzeschockprotein 27 (Tezel et al., 1998), Gamma-Enolase (Maruyama et al., 2000), Glutathion-S-Transferase (Yang et al., 2001a), Antiphosphatidylserine (Kremmer et al., 2001), neuron-spezifische Enolase (Ikeda et al., 2002) und Glykosaminoglykane (Tezel et al., 1999). Auch eine erhöhte Immunreaktivität gegen Alpha-Fodrin konnte nachgewiesen werden (Grus et al., 2006) und dieser Nachweis legte nahe, dass einige Mechanismen in der Pathogenese des Glaukoms mit der Pathogenese in anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie z. B. der Alzheimer Erkrankung, verwandt sind (Grus et al., 2008). Bei Glaukompatienten ließen sich post mortem Antikörper gegen Hitzeschockprotein 27 und 60 in Retina und Sehnerv nachweisen (Tezel et al., 2000). Außerdem wurden bei Patienten mit Normaldruckglaukom Immunglobulinablagerungen in der Ganglienzellschicht der Retina gefunden (Wax et al., 1998b). Bei in vitro Versuchen konnte ermittelt werden, dass die gefundenen Auto-Antikörper in der nachgewiesenen Konzentration prinzipiell dazu in der Lage sind, eine Schädigung retinalen Gewebes, z.B. auch der Gefäße, sowie eine Apoptose der retinalen Ganglienzellen zu verursachen (Tezel et al., 1998). Kürzlich haben sich auch Hinweise auf eine Beteiligung der Komplementkaskade an der Neurodegeneration beim Glaukom ergeben (Stevens et al., 2007).

Im Serum von Patienten mit Normaldruckglaukom und primären Offenwinkelglaukom konnten erhöhte Titer von Interleukin-2-Rezeptoren nachgewiesen werden (Yang et al., 2001b), welche auch in verschiedenen anderen Autoimmunerkrankungen erhöht sind (Mariotti et al., 1992; Ferrarini et al., 1998). Auf Mikroglia (Neufeld, 1999) und GFAP positive Astrozyten (Yang et al., 2001b) wurde ebenfalls eine verstärkte Präsenz von HLA-DR gefunden.

Sowohl im Serum, als auch im Kammerwasser von Glaukompatienten sind komplexe Antikörpermuster gegen okuläre Gewebe nachgewiesen worden, die einen signifikanten Unterschied zu den Mustern von gesunden Probanden zeigten (Grus et al., 2004, 2006; Joachim et al., 2003, 2005). Diese Unterschiede konnten auch bei zwei unabhängigen Studienpopulationen, aus Deutschland und den Vereinigten Staaten von Amerika, beobachtet werden (Grus et al., 2006). Dass es sich dabei

wirklich um Auto-Antikörper handelt, wurde mit menschlichen Antigenen bewiesen (Reichelt et al., 2008; Joachim et al., 2008). Sowohl bei Patienten mit primärem Offenwinkelglaukom als mit Normaldruckglaukom zeigte sich in diesen Studien, in denen komplexe Antikörper-Profile bestimmt wurden, eine deutliche Erniedrigung der Antikörper gegen GFAP und eine deutliche Erhöhung der Antikörper gegen MBP im Vergleich zum gesunden Patientenkollektiv der Kontrollgruppe (Joachim et al., 2008). Insbesondere mit den Antikörpern gegen Glia fibrilläres saures Protein (GFAP) und Myelin basisches Protein (MBP), sowie Antikörpern gegen Sehnerv-Antigene beschäftigt sich diese Arbeit.

1.3.3 Immunprivileg des Auges

Im Körper gibt es einige immunprivilegierte Regionen, zu denen unter anderem die Vorderkammer des Auges zählt (Streilein, 1995a; Janeway et al., 2002). Das Immunsystem ist hier besonders ausgebildet. Es muss das Auge vor eindringenden Antigenen schützen, ohne gleichzeitig das Auge zu gefährden. Fremdes Gewebe kann dadurch im Vergleich zur normalen Immunantwort länger überleben (Benson und Niederkorn, 1992). Das Immunprivileg wird sowohl durch physiologische Barrieren, wie die Blut-Kammerwasser- und die Blut-Retina-Schranke, als auch durch immunkompetente Eigenschaften des Kammerwassers selbst erreicht (Mochizuki et al., 2000). Die physiologischen Barrieren werden aus den Tight-Junctions, der Basalmembran und einer metabolischen Barriere gebildet. Während der Transport von niedermolekularen und lipidlöslichen Substanzen, wie Sauerstoff, Glukose, Transmitter, Albumin, möglich ist, sind Kammerwasser, Retina und Gehirn gegen höhermolekulare Stoffe und Organismen perfekt abgeschottet. Traumen, Entzündungen und Tumore können die Barrieren schädigen, in dem die Tight-Junctions aufgebrochen werden (Ansorge, 2007). Weitere Besonderheiten ergeben sich durch die Hyaluronsäure des Trabekelwerks und das Fehlen des Lymphabflusses (Streilein, 1999). Der Vorteil besteht darin, dass die Vorderkammer gut vor eindringenden Krankheitsverursachern geschützt ist. Der Nachteil ist, dass schon ein geringer Grad an Entzündung das Sehsystem empfindlich stören und eventuell sogar zur Erblindung führen kann (Streilein et al., 1997). Es gibt also eine aktive, differenzierte Immunmodulation in der Vorderkammer (ACAID), die in zahlreichen Tierversuchen nachgewiesen wurde (Kaplan und Streilein, 1977; Streilein, 1995b).

1.4 Versuchsansatz

1.4.1 Tiermodell: Experimentelles Autoimmun Glaukom Modell

Sind Autoantikörper bei einer bestimmten Erkrankung nachweisbar, so kann man drei mögliche Theorien aufstellen, wie der Zusammenhang dieser beiden Erscheinungen zu erklären ist:

1. Der Autoantikörper verursacht eine bestimmte Läsion, die zu der besagten Erkrankung führt.
2. Der Krankheitsprozess ruft eine Gewebeschädigung hervor, die dann sekundär zur Bildung der Autoantikörper führt.
3. Das Vorliegen der Erkrankung und der Nachweis von Autoantikörpern sind unabhängig von einander.

Um zu klären, welche der Theorien die richtige ist, ist normalerweise ein Tiermodell erforderlich.

Die Frage, ob von einem Versuchstier gebildete Antikörper Auslöser einer Erkrankung sein können, ist oft nicht einfach zu beantworten. Der Vorgang kann nicht in Einzelschritte zerlegt werden und somit häufig nicht auf andere Weise als in einem Tierversuch nachvollzogen werden. Im Bezug auf das Glaukom heißt das, dass in vitro Modelle den Tod von retinalen Ganglienzellen, der durch Beteiligung des Immunsystems hervorgerufen werden könnte, nicht so darstellen können, wie dies in einem in vivo Modell der Fall ist.

In der Forschung zum Glaukom sind bereits verschiedene Tiermodelle etabliert. Meist wird dabei eine direkte Schädigung der retinalen Ganglienzellen oder des Sehnervs verursacht. Besonders häufig werden Methoden verwendet, in denen der Augeninnendruck erhöht wird, in dem ein erhöhter Widerstand für den Kammerwasserabfluss im Vorderkammerwinkel erzeugt wird. Dieser Widerstand kann durch Injektion einer hypertonschen Kochsalzlösung in die Kammerwasserabflusswege (Tezel et al., 2005) oder durch Laserbehandlung des Trabekelwerks (Levokovitch-Verbin et al., 2002) erhöht werden. Außerdem gibt es Modelle, bei denen der Augeninnendruck durch einen Gendefekt erhöht ist (Pang and Clark, 2007). Des Weiteren gibt es das Modell, in dem die Retina und ihre Zellen durch Ischämie geschädigt werden (Büchi et al., 1991; Li et al., 2002; Ozden et al., 2001), sowie das Modell der Sehnervenkompression (Maeda et al., 2004; Yoles et al., 1998; Tezel et al., 2004). Eine mögliche ursächliche Beteiligung des Immunsystems wird durch keines dieser Modelle beleuchtet.

Bei anderen Erkrankungen haben sich bereits Modelle zur Überprüfung einer autoimmunen Beteiligung durchgesetzt. So sind sowohl das Tiermodell zur Experimentellen Autoimmun Uveitis (Caspi, 2003; Grus et al., 1996, 1997 a und b; Wildner et al., 2008), als auch zur Experimentellen Autoimmun Enzephalitis (Guo et al., 2004; Lassmann, 2007; Winer et al., 2001) anerkannt und konnten neue Erkenntnisse hinsichtlich Pathophysiologie und Therapiemöglichkeiten liefern.

Bei solchen Immunisierungsmodellen werden Freund's Adjuvant und Pertussistoxin als zwei Standardkomponenten verwendet. Freund's Adjuvant ist ein Gemisch aus Mannose und Paraffinöl, das einerseits als Trägersubstanz des Antigens dient und andererseits die Makrophagen und Leukozyten des Immunsystems aktiviert. Durch seine Depotwirkung werden Antigene verzögert freigesetzt, wodurch sich der Kontakt des Antigens zum Immunsystem verlängert (Nicklas et al., 1997). Pertussistoxin, das Exotoxin des Bakteriums *Bordetella pertussis*, kann die Permeabilität der Endothelzellen von Bluthirnschranke (BHS) und Blutretinaschranke (BRS) durch Beschädigung der Tight-Junctions stark erhöhen (Brückener et al., 2003). Dadurch kann es eine Verstärkung der zu erwartenden Erkrankung bewirken (Kamradt et al., 1991; Munoz und Sewell, 1984).

Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Tiermodell, das sich an Studien der Forschungsgruppe um Wax anlehnt, dient der Überprüfung eines kausalen Zusammenhangs zwischen der Erhöhung von bestimmten Antikörpern und dem Verlust von retinale Ganglienzellen. Es dient als experimenteller Ansatz zur Erforschung des autoimmunen Glaukoms und wird deshalb kurz als EAG (Experimentelles Autoimmun Glaukom) bezeichnet.

1.4.2 Visuell evozierte Potentiale am Experimentellen Autoimmun Glaukom Modell

Bisher war es bei Tiermodellen üblich, einen möglichen Schaden des Sehsystems mittels Quantifizierung von intakten Zellen nach Versuchsabschluss einzuschätzen. Auch nach der Immunisierung mit Antikörpern gegen Hitzeschockprotein 27 und 60 konnte durch histologische Färbung ein Verlust von retinalen Ganglienzellen beobachtet werden (Wax und Tezel, 2002; Wax et al., 2008; Joachim et al., 2009). Diese Quantifizierung gibt aber keinen Aufschluss über die Funktion der Zellen. Sowohl eine massiv reduzierte Funktion bei erhaltener Morphologie, als auch ein Zellverlust ohne Auswirkung auf die Sehleistung, wären denkbar. Eine funktionelle

Testung der Sehfunktion, wie sie auch in der Klinik angewendet wird, ist also wünschenswert. Um die Auswirkungen der Immunisierung der verschiedenen Gruppen auf die visuelle Funktion der Tiere zu bewerten, erscheint es demnach sinnvoll, diese noch am lebenden Tier zu untersuchen.

Visuell evozierte Potentiale sind die einzige Möglichkeit, die Funktion der kompletten Sehbahn objektiv zu Quantifizieren. In der Forschung können sie dazu beitragen, den Einfluss von Krankheitsmodellen und ihrer möglichen Behandlung besser zu beurteilen. Wie oben beschrieben, gibt es bestimmte Pathologien der visuell evozierten Potentiale, die die Diagnose eines Glaukoms frühzeitig ermöglichen. Durch verschiedene Studien ist bewiesen, dass visuell evozierte Potentiale in Ratten durchaus mit denen beim Menschen zu vergleichen sind (Jehle et al., 2008, 2009).

Die Methode der VEP-Messungen mittels eines chronischen Implantatmodells in wachen, unbehandelten Ratten ist unabhängig von der Refraktion des Auges und der Anästhesie der Tiere. Von Jehle und seinen Mitarbeitern wurde diese Methode schon erfolgreich dazu angewandt, den Einfluss von Anästhesie, okulärer Ischämie und Sehnervenkompression auf die visuelle Funktion nachzuweisen (Jehle et al., 2009). Des Weiteren wurde von dieser Arbeitsgruppe auch ein Vergleich von drei Methoden zur Bestimmung der Sehfunktion durchgeführt. Verglichen wurde hier der Einfluss unterschiedlich starker ischämischer Schädigung auf visuell evozierte Potentiale, Elektroretinogramme und die Anzahl vitaler retinalen Ganglienzellen durch retrograde Injektion von Fluoro-Gold. Auch dabei haben sich die visuell evozierten Potentiale bewährt (Jehle et al., 2008).

Durch die Durchführung von visuell evozierten Potentialen beim Experimentellen Autoimmun Glaukom können bereits zu einem früheren Zeitpunkt Aussagen über die Auswirkungen der Immunisierung getroffen werden, welche in Bezug auf die retinalen Ganglienzellen keinen quantitativen strukturellen, sondern einen qualitativen funktionellen Wert haben.

2. Ziel der Untersuchung

Nach wie vor ist die Pathogenese des Glaukoms unklar. Zahlreiche Arbeitsgruppen haben in den letzten Jahren Hinweise auf eine eventuell beteiligte autoimmune Komponente gefunden. Besonders Antikörper gegen verschiedene Antigene von Sehnerv und Retina nehmen dabei eine zentrale Rolle ein. Antikörper gegen Glia fibrilläres saures Protein zeigten in komplexen Antikörper-Profilen aus Serum von Patienten sowohl mit primärem Offenwinkelglaukom als auch mit Normaldruckglaukom eine Erniedrigung im Vergleich zur Kontrollgruppe, während Antikörper gegen Myelin basisches Protein, die auch bei Patienten mit Multipler Sklerose detektiert werden und im Tiermodell eine Experimentelle Autoimmun Enzephalitis erzeugen können, erhöht waren. Die Frage, ob eine Immunisierung mit diesen Antigenen bei Versuchstieren zu einer Immunreaktion führt, die den Untergang von retinalen Ganglienzellen zur Folge hat, soll in dieser Studie beantwortet werden.

Die bisher etablierten Tiermodelle zum Glaukom eignen sich nicht zur Überprüfung autoimmuner Aspekte, da die verschiedenen Modelle meist mit einer direkten Schädigung der retinalen Ganglienzellen oder des Sehnervs einhergehen. Da bereits ein Verlust retinaler Ganglienzellen durch Immunisierung mit Hitzeschockprotein 27 und 60 beobachtet wurde, soll ein ähnliches Tiermodell verwendet werden, bei dem mögliche Verluste von retinalen Ganglienzellen nach Immunisierung nachgewiesen werden sollen.

Während des Verlaufs der Studie soll zum einen die mögliche Ausbildung eines Glaukoms und zum anderen ein eventueller Verlust von retinalen Ganglienzellen bei den Tieren durch verschiedene Untersuchungsmethoden kontrolliert werden. Als klinisch etablierte Methoden zur Diagnostik des Glaukoms dienen dabei die Augeninnendruckmessung und die Funduskopie. Die Ableitung visuell evozierter Potentiale ist ein sensibles Verfahren zur Überprüfung der Reizweiterleitung innerhalb der Sehbahn. Diese Untersuchung soll Aufschluss über eventuell eingetretene Verluste von retinalen Ganglienzellen geben. Nach Tötung der Tiere sollen die Gehirne entnommen und histologisch auf Entmarkungsherde untersucht werden, wie sie sich bei Patienten mit multipler Sklerose und dem dazugehörigen Tiermodell der Experimentellen Autoimmun Enzephalitis zeigen.

Die Arbeit soll den retinalen Ganglienzellverlust am Experimentellen Autoimmun Glaukom Modell nachweisen.

3. Material

Material

Alkoholisches Hautantiseptikum
Aquabidest
Aufblockform
Ausgießstation
Bechergläser
Bepanthen Augen- und Nasensalbe
BSS-Lösung
Deckgläser
Digitalkamera
Einbettautomat
Einmalhandschuhe
Einmalnadeln
Einmalpasteurpipetten
Einmalpipetten
Einmalskalpelle (steril)
Einmalspritzen
Elektrodendraht
Epi-Ständer
Ethanol (verschieden %ig)
Falcontubes (15ml)
Forene (Isofluran)
Formalin 4%
Freunds Adjuvant
Gentamicin-POS
Gewebeeinbettkiste
GFAP
Glasröhrchen
Heiz- und Magnetrührer
Histogefäße
Histowärmebad
Hochwertige Leckerbissen für Nagetiere
Infrarotlampe
Kaltlichtquelle
Ketamin-ratiopharm

Hersteller

Fresenius, Bad Homburg
Apotheke, Uniklinik Mainz
Reichert Jung, Heidelberg
Sakura Tissue Tek, Zoeterwoude (Holland)
Fisher, Frankfurt
Bayer, Leverkusen
Apotheke, Uniklinik Mainz
Diagonal, Münster
Sony, Berlin
Sakura Tissue Tek, Zoeterwoude (Holland)
Ansell, Brüssel (Belgien)
Braun, Melsungen
Sarstedt, Nümbrecht
Fisher, Frankfurt
Aesculap, Tuttlingen
Braun, Melsungen
Omega Baumarkt, Freiburg
Fisher, Frankfurt
Merck, Darmstadt
Fisher, Frankfurt
Abbott, Wiesbaden
Apotheke, Uniklinik Mainz
Sigma, Steinheim
Ursapharm, Saarbrücken
Vogel Histo Comp, Gießen
Zytomed Systems, Berlin
NeoLab Migge, Heidelberg
H+P Labortechnik, Oberschleissheim
Pathologie, Uniklinik Freiburg
Reichert Jung, Heidelberg
Pitti Heimtierprodukte, Recklinghausen
Philips, Drachten (Holland)
Kaiser Macrospot 1500, Buchen
Ratiopharm, Ulm

Kresylviolett	Merck, Darmstadt
Kryo Konsole	Miles Scientific, Naperville (USA)
MBP	Sigma, Steinheim
Microsoft Office XP	Microsoft GmbH, Unterschleißheim
Mikroliter Syringe	Hamilton, Bonaduz (Schweiz)
Mikroliterzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Mydraticum Stulln	Pharma Stulln, Stulln
Novesine 0,4%	Omnivision GmbH, Puchheim
Objektträger	Diagonal, Münster
OP-Mikroskop	Zeiss, Dresden
Papiertücher (Kleenex)	Wepa, Arnsberg
Paraformaldehyd	VWR, Dietikon (Schweiz)
Personal Copmputer	Acer, Taipeh (Taiwan)
Pertussistoxin	Sigma, Steinheim
Phosphat gepufferte Saline (PBS)	Cambrex, Verviers (Belgien)
Pinzetten	NeoLab Migge, Heidelberg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Plastikkäfig	Zoohandlung, Mainz
Präparierbesteck	Geuder AG, Heidelberg
Rattenblutentnahmehalterung	VWR, Dietikon (Schweiz)
Rindersehnerv	Schlachthof, Alzey
Safe Lock tubes 0,5 und 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Saugunterlagen	Apotheke, Uniklinik Mainz
Schlittenmikrotom HN 40	Reichert Jung, Heidelberg
Schutzbrille	Uvex, Fürth
Sharpsafe Sammelbehälter	Frontier Medical Products, Köln
Tonopen	Medtronic, Jacksonville (USA)
Tonopen Tip Covers	Medtronic, Jacksonville (USA)
Waage	Soehnle, Backnang
Wecker	Fisher, Frankfurt
Xylazin Rompun 2%	Bayer, Leverkusen
Xylol	Merck, Darmstadt

4. Methoden

4.1 Studiendesign

2 Wochen vor Immunisierung:

Voruntersuchung, randomisierte Gruppierung, Augeninnendruckmesstraining zur Eingewöhnung der Tiere an Personal und Material

1 Woche vor Immunisierung:

Augeninnendruckmessung, Schwanzvenenblutentnahme, Fundusuntersuchung

Tag 0: Immunisierungen

GFAP-Gruppe	(n=10):	GFAP + Freund's Adjuvant + Pertussistoxin
MBP-Gruppe	(n=10):	MBP + Freund's Adjuvant + Pertussistoxin
Sehnerv- Gruppe	(n=12):	homogenisierter Rindersehnerv + Freund's Adjuvant + Pertussistoxin
Kontrollgruppe	(n=10):	Kontrollgruppe ohne Immunisierung

2 Wochen nach Immunisierung:

Augeninnendruckmessung, Schwanzvenenblutentnahme, Fundusuntersuchung
Tod zweier Tiere aus der Sehnerv-Gruppe, Herzpunktion zur Blutentnahme, Kammerwasserentnahme und Augenentnahme

4 Wochen nach Immunisierung:

Augeninnendruckmessung, Schwanzvenenblutentnahme, Fundusuntersuchung

5 Wochen nach Immunisierung:

doppelte Messung der visuell evozierten Potentiale, Tod aller Tiere, Blutentnahme mittels Herzpunktion, Kammerwasserentnahme, Augenentnahme, Gehirnentnahme

4.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden 42 männliche Lewis Ratten mit einem Ausgangsgewicht von 200 – 250 g verwendet, die von Charles River bezogen wurden.

Lewis Ratten wurden in den fünfziger Jahren von Doktor Lewis ausgehend vom Wistar Stamm gezüchtet und eignen sich für unser Vorhaben besonders. Sie haben einen Defekt in der Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse. Durch diesen Defekt sind sie nicht in der Lage ihre Kortikosteroidwerte im Serum effektiv physiologischem Stress anzupassen. Somit sind sie besonders anfällig für Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel die Adjuvant induzierte Arthritis (Sternberg et al., 1989). Deshalb wurden sie schon erfolgreich in Versuchen zur Experimentellen Autoimmun Enzephalitis (EAE) (Kang et al., 2009; Schneider et al., 2009), zur Experimentellen Autoimmun Uveitis (EAU) (Augustin et al., 1999; Bora et al., 1995; Gregerson et al., 1990; Grus et al., 2001) und zur paraneoplastischen Retinopathie (Adamus et al., 2003; Ohguro et al., 1999) eingesetzt.

Des Weiteren ist der retinale Blutkreislauf von Lewis-Ratten dem des Menschen sehr ähnlich, ebenso wie der Aufbau der Blut-Hirn- und der Blut-Retina-Schranke, die in dieser Studie eine wichtige Bedeutung. Außerdem ist die Blutentnahme bei Albino-Tieren einfacher durchzuführen als bei Wildtypen, da sich die Venen besser abzeichnen.

Nach Anlieferung erfolgten eine erste Untersuchung, sowie eine randomisierte Gruppierung. Die Tiere wurden in der Rattenexperimentalhaltung der Zentralen Versuchstiereinrichtung der Universität Mainz in standardisierten Käfigen mit Spielzeug und Versteckmöglichkeiten zu fünft untergebracht und dort 12 Stunden Tag-/Nacht-Zyklen bei konstanten 23 °C ausgesetzt. Die Tiere erhielten Wasser und kommerziell erhältliche Pelletnahrung für Nager zur freien Verfügung.

Mit Studienbeginn wurden die Ratten täglich kontrolliert und wöchentlich gewogen. Darüber hinaus erfolgten bei jedem erneuten Messzyklus gesonderte Untersuchungen, bei denen die Augen insbesondere auf Rötung, Schwellung, Gefäßneubildung und Ausfluss begutachtet wurden. Die Koordination der Tiere, die Injektionsstelle sowohl der Immunisierung als auch der Narkosemittel, die Atmung, der Stuhl und die Mundhöhle wurden ebenfalls beurteilt. Gewichtsverlust, eventuelle Blutungen, eingerissene Nägel, sowie Haarausfall oder andere Läsionen und Auffälligkeiten wurden gegebenenfalls dokumentiert.

Neben den Studienleitern führten die Tierpfleger der Versuchstiereinrichtung zusätzlich regelmäßige Kontrollen durch und wurden angewiesen Unregelmäßigkeiten unmittelbar zu berichten.

4.3 Immunisierung

Die Immunisierungen folgten einem vor Studienbeginn genau festgelegten Schema. Die Injektionsmittel wurden immer am Tag der Immunisierung, wie in Tabelle 1 dargestellt, hergerichtet und in eine 1 ml Luer-Lok Spritze aufgezogen. Die zu immunisierenden Gruppen erhielten ein Gemisch des jeweiligen Antigens mit inkompletten Freund's Adjuvant und Pertussistoxin. Wie man der Tabelle 1 ebenfalls entnehmen kann, erhielten die Kontrolltiere keine Immunisierung und somit auch keine Injektion.

Gruppe	Antigen zur Immunisierung	Freund's Adjuvant	Pertussistoxin
GFAP	100 µg / 100 µl GFAP	100 µl	10 µl
MBP	1 mg / 500 µl MBP	100 µl	10 µl
Sehnerv	8 mg / 1 ml Sehnerv-Homogenat	100 µl	10 µl
Kontrolle	-	-	-

Tabelle 1: Die Immunisierungsschemata der einzelnen Gruppen mit genauer Angabe der Bestandteile und ihrer Konzentrationen.

Die Applikation erfolgte intraperitoneal bei allen zu immunisierenden Tieren in den linken unteren Quadranten des Abdomens mittels einer 20 Gauge Kanüle. Damit die Injektionen auch exakt an der richtigen Stelle und in der richtigen Tiefe eingebracht wurden, erfolgte ihre Durchführung immer zu zweit. Eine Person übernahm die stabile Fixierung der Tiere, eine weitere führte die Applikation durch. Unmittelbar nach der Immunisierung und dann in täglichen Abständen wurden die Tiere noch auf Bewegungsstörungen, Blutungen, Knotenbildungen und Entzündungen an der Injektionsstelle untersucht.

4.4 Herstellung des Sehnerv-Homogenats

Während zur Immunisierung der GFAP- und MBP-Gruppe vorgefertigte Antigene gekauft wurden, erfolgte die Immunisierung der Sehnerv-Gruppe mit einem aus Rindersehnerven selbst hergestellten Homogenat.

Hierzu wurden Rindersehnerven verwendet. Diese wurden mit Mörser und Pistill zermahlen und dabei mit flüssigem Stickstoff übergossen bis ein homogenes mehlintiges Pulver entstand, welches leicht mit PBS verdünnt wurde.

Durch photometrische Messung mit dem Multiscan Ascent wurde eine Proteinbestimmung vorgenommen. Es erfolgte eine Verdünnung mit PBS bis eine Proteinkonzentration von 8 mg/ml vorlag.

Das Homogenat stellt in dem hier durchgeführten Versuch ein neuronales Antigen-Gemisch dar. Formal kann das Homogenat nicht als Auto-Antigen-Gemisch gelten, da es sich nicht um Antigene derselben Spezies handelt. Aber es gilt als allgemein akzeptiert, dass die Verwandtschaft der Antigene ausreichend groß ist. Es steht damit im Gegensatz zu den beiden anderen Gruppen, bei denen genau ein bestimmtes Antigen verabreicht wurde.

Deshalb wurde bei der Versuchsplanung diese Gruppe mit zwei zusätzlichen Tieren bedacht, die schon zu einem früheren Zeitpunkt getötet wurden, da hier die stärkste und früheste Reaktion erwartet wurde.

4.5 Augeninnendruckmessung

Die Augeninnendruckmessung erfolgte eine Woche vor und jeweils zwei und vier Wochen nach Immunisierung in der Zeit zwischen 08.00 und 11.00 Uhr. Da es aus klinischer Erfahrung bekannt ist, dass es Schwankungen des Augeninnendrucks zu verschiedenen Tageszeiten gibt, wurde bewusst immer zur gleichen Uhrzeit gemessen. Die Messung wurde mit Hilfe eines Tonopen durchgeführt. Eigentlich für den klinischen Bereich und zur Eigenmessung von Patienten entwickelt, wurde der Tonopen schon mit Erfolg von verschiedenen Forschungsgruppen zur Messung an Ratten angewendet (Mermoud et al., 1994; Moore et al., 1993; Thanos und Naskar, 2004).

Ein Tonopen hat die Form eines Stiftes, an dessen Spitze sich das Messköpfchen mit einem druckempfindlichen Sensor befindet. Zur Messung wird den Tieren vorsichtig ein Auge aufgehalten und die Kornea leicht mit dem Messköpfchen berührt. Dieser Vorgang ist in Abbildung 3 dargestellt. Ein kurzer Ton signalisiert die erfolgte Messung, deren Ergebnis unmittelbar auf der digitalen Anzeige des Gerätes abgelesen werden kann. Diese Methode ist nicht invasiv und erfordert daher keine Narkose.

Das Messköpfchen ist mit einem sterilen Überzieher aus Latex überzogen. Durch seinen regelmäßigen Wechsel werden die Kontamination des Tonopen und die infektiöse Übertragung von Tier zu Tier nahezu ausgeschlossen.



Abbildung 3: Messung des intraokularen Druckes mit dem Tonopen.
Quelle: Corinna Mühleib

Nach einer Eingewöhnungszeit zu Beginn der Studie, in der sich die Tiere an das Gerät, seine Geräusche und die Messung adaptieren konnten, tolerierten die Tiere die Messungen meist gut. Sie zeigten keine Anzeichen von Unwohlbefinden, Irritationen der Augen oder Schmerzen.

Zu jedem Untersuchungszeitpunkt erfolgten zehn Messungen pro Auge. Aus diesen Werten wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und der statistische Fehler für jedes Tier und jede Gruppe berechnet. Außerdem erfolgte zur Bestimmung des Signifikanzniveaus der verschiedenen Ergebnisse ein Tukey-HSD-Verfahren.

4.6 Funduskopie

Die Funduskopie erfolgte ebenfalls eine Woche vor und jeweils zwei und vier Wochen nach der Immunisierung.

Die Tiere erhielten eine intramuskulär injizierte Narkose mit Ketamin und Xylazin zu den verschiedenen Terminen abwechselnd in den linken und rechten Oberschenkelmuskel. Die Applikation erfolgte mit einer 1 ml Luer-Lok Spritze und einer 26 Gauge Kanüle. Die Dosierungen der beiden Wirkstoffe wurden stets an das

Gewicht der Tiere adaptiert. Ketamin wurde in einer Konzentration von 5 mg/kg Körpergewicht und Xylazin mit 45 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Diese Narkose zeichnet sich durch höchste Potenz bei kleinstem Volumen aus. Xylazin wirkt als zentraler und peripherer α_2 -Adrenozeptor-Agonist. Der Wirkstoff bewirkt eine ausgeprägte Sedierung, hat schmerzstillende (Analgesie) und zentral muskelrelaxierende Wirkung. Ketamin ist sowohl ein schlafherzeugendes Mittel (Hypnotikum) als auch ein potentes Analgetikum. Charakteristisch für die Wirkung des Ketamin ist die Erzeugung einer so genannten „dissoziativen Anästhesie“. Darunter wird die Erzeugung von Schlaf und Schmerzfreiheit unter weitgehender Erhaltung der Reflextätigkeit, insbesondere der Schutzreflexe, verstanden. Atropin Augentropfen wurden zur Dilatation der Pupillen verabreicht. Atropin ist ein Parasympatholytikum und hemmt die muskarinartigen Wirkungen des Acetylcholins durch kompetitive Inhibition der Acetylcholinrezeptoren an der postsynaptischen Membran. Novesine, ein topisches Lokalanästhetikum, wurde gleichermaßen ins Auge getropft.

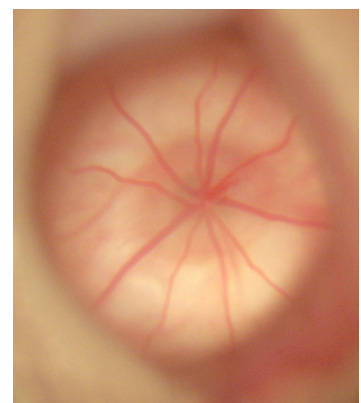
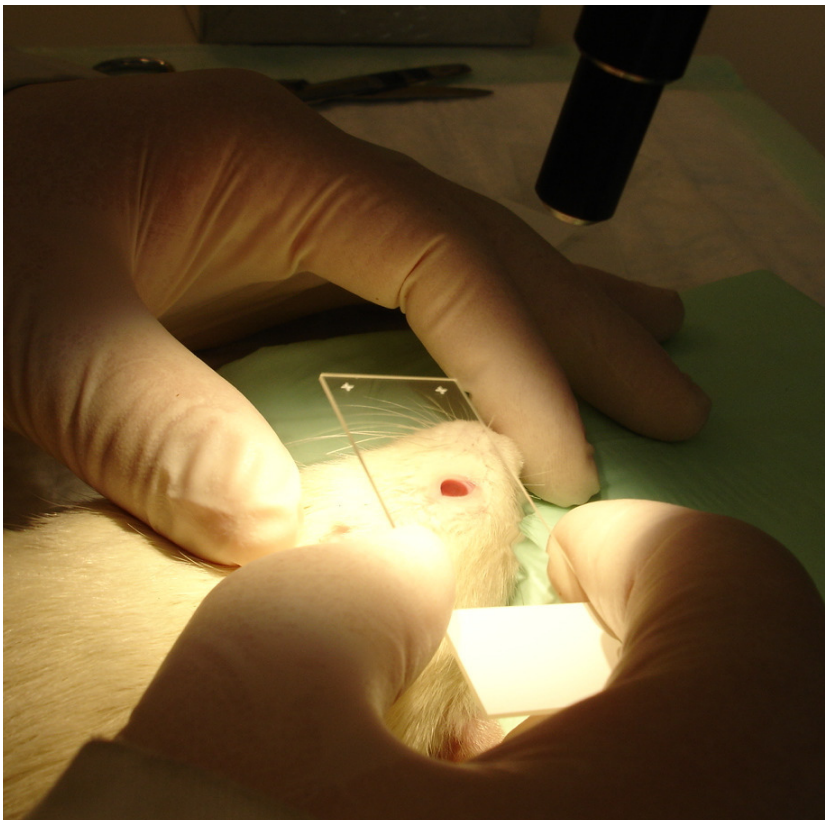


Abbildung 4: Links wird der Einsatz des Objektträgers zur Funduskopie dargestellt. Rechts wird die Sicht durch die seitlich montierten Zusatzokulare auf den Rattenfundus gezeigt, die der photographischen Dokumentation dienen.

Quelle: Corinna Mühleib

Mittels eines Objektträgers wurde die Krümmung der Kornea vorsichtig so begradigt, dass mit dem Operationsmikroskop die Spiegelung des Augenhintergrundes uneingeschränkt möglich war. Während der Messung wurden die Augen durch regelmäßige Beträufelung mit BSS vor Austrocknung geschützt. BSS ist eine besondere Spüllösung, deren Elektrolytzusammensetzung Kammerwasser ähnelt. Ein weiterer Untersucher hielt mit einer Digitalkamera durch zusätzlich seitlich montierte Okulare die Beobachtungen photographisch fest.

Abbildung 4 zeigt den Einsatz des Objektträgers und den Blick durch die seitlichen Okulare, durch die die Photodokumentation erfolgte.

Zu Dokumentationszwecken und für die nachträglich vergleichende Analyse wurden mindestens drei Aufnahmen pro Auge gemacht. Außerdem wurden die Befunde in dem zuvor beschriebenen Tierbeobachtungsbogen vermerkt.

Nach der Messung wurde den Tieren Bepanthen-Salbe ins Auge gegeben. Dies verhinderte die eventuell mögliche Austrocknung der Augen, da durch die Narkose der natürliche Blinkreflex der Tiere unterdrückt wurde.

Bis zum vollständigen Erwachen der Tiere aus der circa 90-minütigen Narkose, wurden ihre Vitalzeichen in kurzen Abständen kontrolliert. Erst dann wurden die Tiere in ihre Käfige zurückgesetzt.

4.7 Messung visuell evozierter Potentiale (VEPs)

4.7.1 Implantation der Elektroden

Zur Ableitung visuell evozierter Potentiale wurden fünf Elektroden implantiert. Dabei kam eine spezielle selbst angefertigte Halteapparatur zum Einsatz. Diese besteht aus einem dünnen Metallstab, welcher eine Aussparung zum Einhängen der Zähne besitzt. Über eine daran befestigte 14 Gauge Nadel sowie über einen sechs Millimeter messenden Schlauch, welcher direkt vor der Nase des Tieres zu liegen kommt, kann das Narkosemittel appliziert werden. Die Schnauze wurde über eine kleine, mit einer Schraube versehene Metall-Leiste fixiert, wodurch stabile Versuchs- und Operationsbedingungen geschaffen wurden. Die Narkose erfolgte mit einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch. Die Konzentration von Isofluran betrug dabei 4 %. Die Körpertemperatur wurde mittels Heizmatte konstant gehalten und die Augen zum Schutz vor Austrocknung mit Bepanthen-Augensalbe bedeckt.

Das Fell am Kopf und zwischen den Schulterblättern wurde mit Kochsalzlösung benetzt und vorsichtig mit einem Skalpell entfernt. Aufliegende abgelöste Haare

wurden sorgfältig beseitigt. Nach gründlicher Desinfektion mit Iodlösung folgte eine circa 2 bis 3 cm lange saggitale Inzision oberhalb der Sutura coronalis mit anschließender Spreizung der Wundränder mittels Lidspreizer. Die Kalotte wurde mit einem Raspatorium gründlich von dem anhaftenden Periost befreit und eventuelle Blutungen sowie die Suturen gekautert. Danach erfolgte die Anlage von zwei Bohrlöchern im Os parietale jeweils circa 3 mm entfernt von der Sutura saggitalis und lambdaoidea und die Anlage von zwei Bohrlöchern im Os frontale jeweils circa 3 mm entfernt von der Sutura frontalis und coronalis in einer Dicke von 0,5 mm. Die Position der Bohrlöcher ist in Abbildung 5 veranschaulicht.

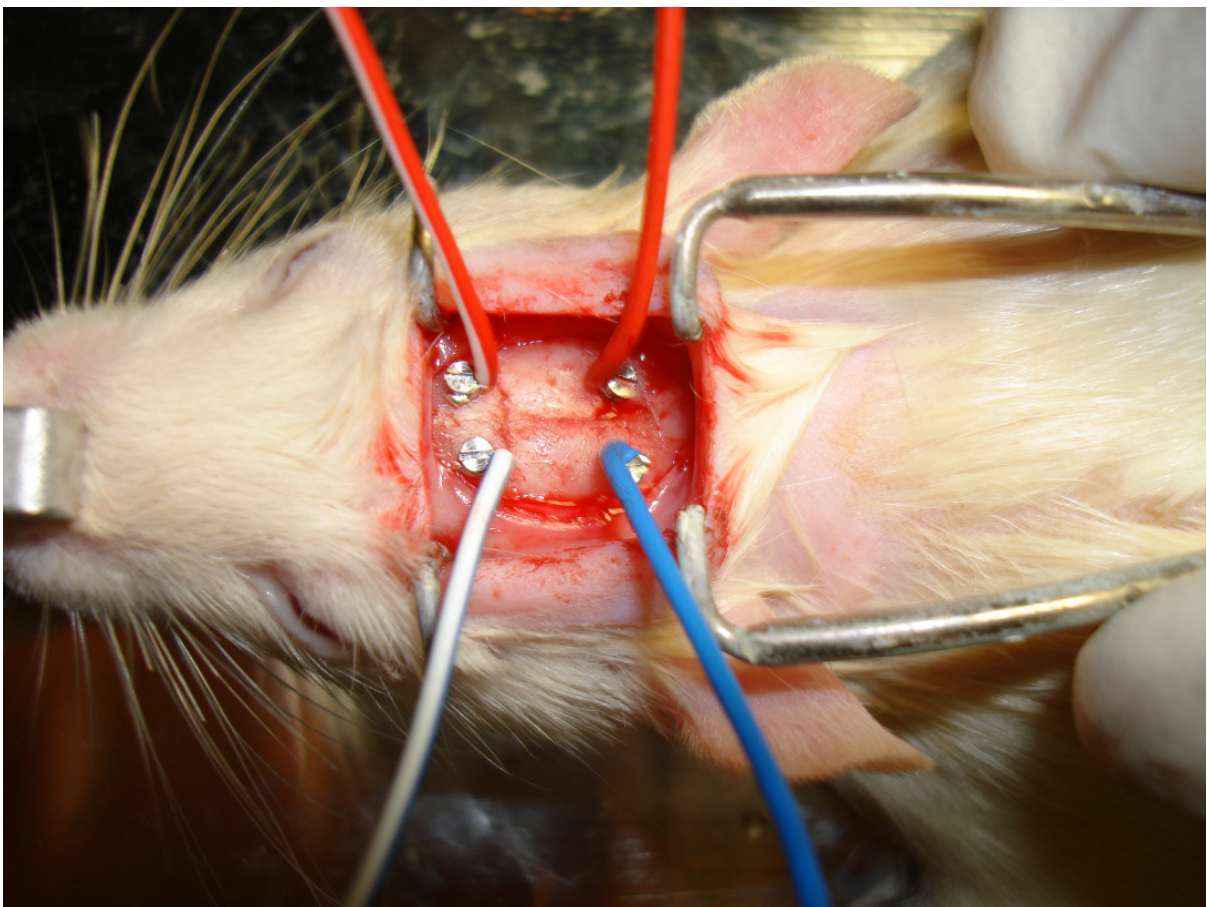


Abbildung 5: Es ist die intraoperative Position der Elektroden in Relation zu den Schädelnähten abgebildet.
Quelle: Corinna Mühleib

Die Anlage erfolgte mit einem elektrischen Bohrer unter strenger Schonung des Gehirns, wodurch Blutungen weitgehend verhindert werden konnten. Die Elektroden mit den passenden Schrauben konnten dann vorsichtig eingebracht werden. Zur Isolierung der Elektroden untereinander und zur definitiven Fixierung der Elektroden an der Kalotte wurde eine Zweikomponentenknete dünn aufgebracht, welche nach

kurzer Zeit ohne Hitzeentwicklung aushärtete. Nach Applikation von Refobacin-Augensalbe wurde die Wunde so mit Einzelknopfnähten verschlossen, dass die Kabel der Elektroden zwischen den Ohren der Ratte austraten. Der Wirkstoff in Refobacin-Augensalbe ist Gentamycin, ein Aminoglykosidantibiotikum, das ein breites Wirkspektrum gegen aerobe Keime hat und zur Therapie einer Konjunktivitis und Osteitis geeignet ist. Durch diese Anordnung der Elektroden waren die Lage der Referenzelektroden über dem Frontalhirn, sowie die der Messelektroden über dem Colliculus superior, dem Projektionsgebiet der retinalen Ganglienzellen, gesichert. Für die Rückenelektrode wurde die rasierte Stelle zwischen den Schulterblättern ebenfalls inzidiert und es wurde mit der Schere durch stumpfes Präparieren eine kleine Tasche gebildet. Hier ließ sich nun die Rückenelektrode einbringen und mit Einzelknopfnähten fixieren. Sie wurde locker auf der Muskulatur aufgelegt und diente der Erdung. Zur Vorbeugung von Infektionen wurde hier ebenfalls Refobacin-Augensalbe aufgebracht bevor die Wunde komplett verschlossen war. Die vollständige Implantation ist in Abbildung 6 zu sehen.

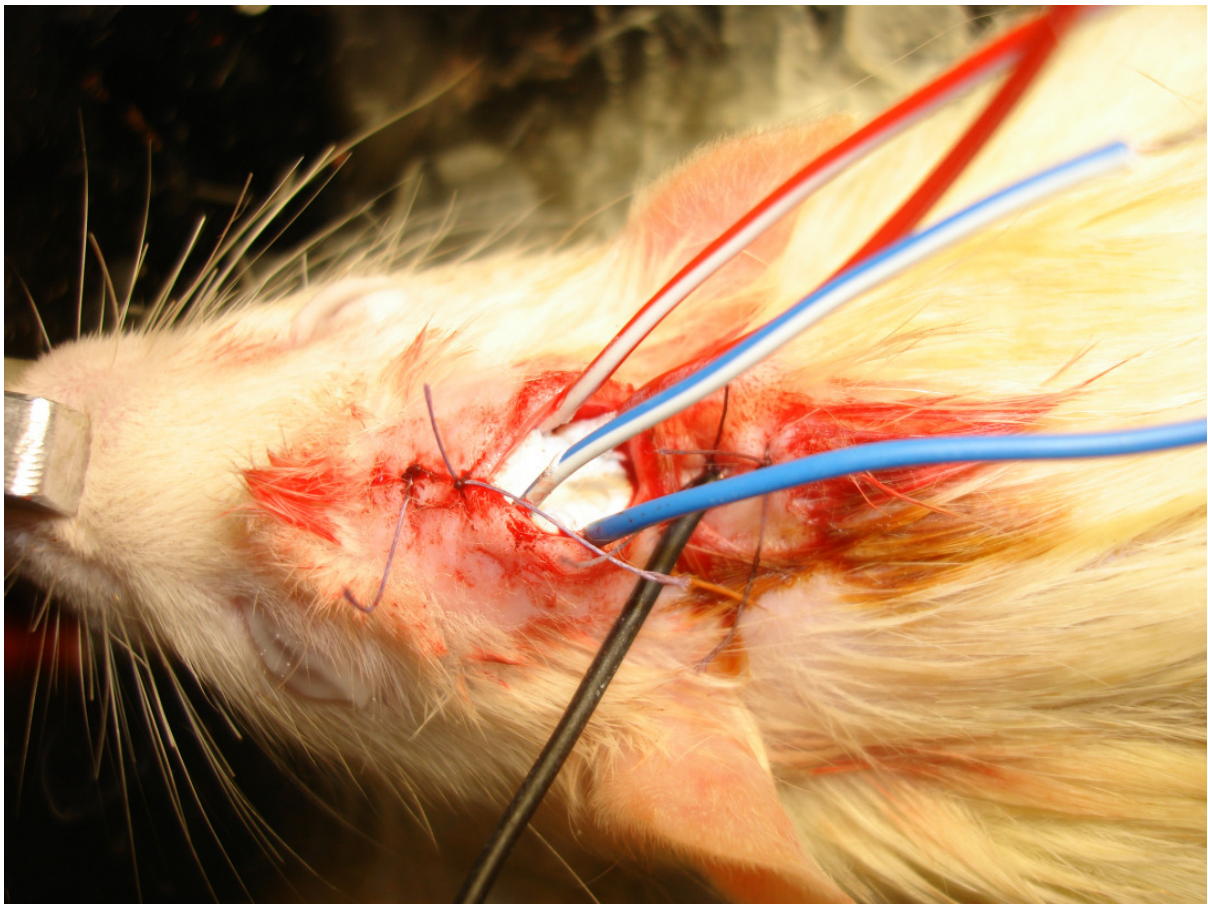


Abbildung 6: Es ist das Endresultat der Implantation mit Elektroden, Erdung, dentalem Acryl und Hautnähten zu sehen.
Quelle: Corinna Mühleib

Nach dem Eingriff wurde die Narkose beendet. Die Tiere wurden in kurzen Abständen bis zum Erwachen und nochmals eine Stunde danach kontrolliert. Nach der Implantation wurden die Tiere in Einzelkäfigen gehalten, um eine Explantation der Elektroden beim gemeinsamen Spielen zu vermeiden. Jedes Tier erhielt vor den folgenden Untersuchungen eine zweitägige Ruhephase.

4.7.2 Ableitung der visuell evozierten Potentiale

Die Messung der visuell evozierten Potentiale erfolgte am Nachmittag des zweiten Tages nach der Implantation und wurde am darauf folgenden Tag wiederholt, um die Ergebnisse zu reproduzieren. Die Immunisierung der Tiere lag zu diesem Zeitpunkt bereits fünf Wochen zurück.

Die den Ratten implantierten Elektroden wurden, wie in Abbildung 7 zu sehen, an ein Verstärkersystem angeschlossen.

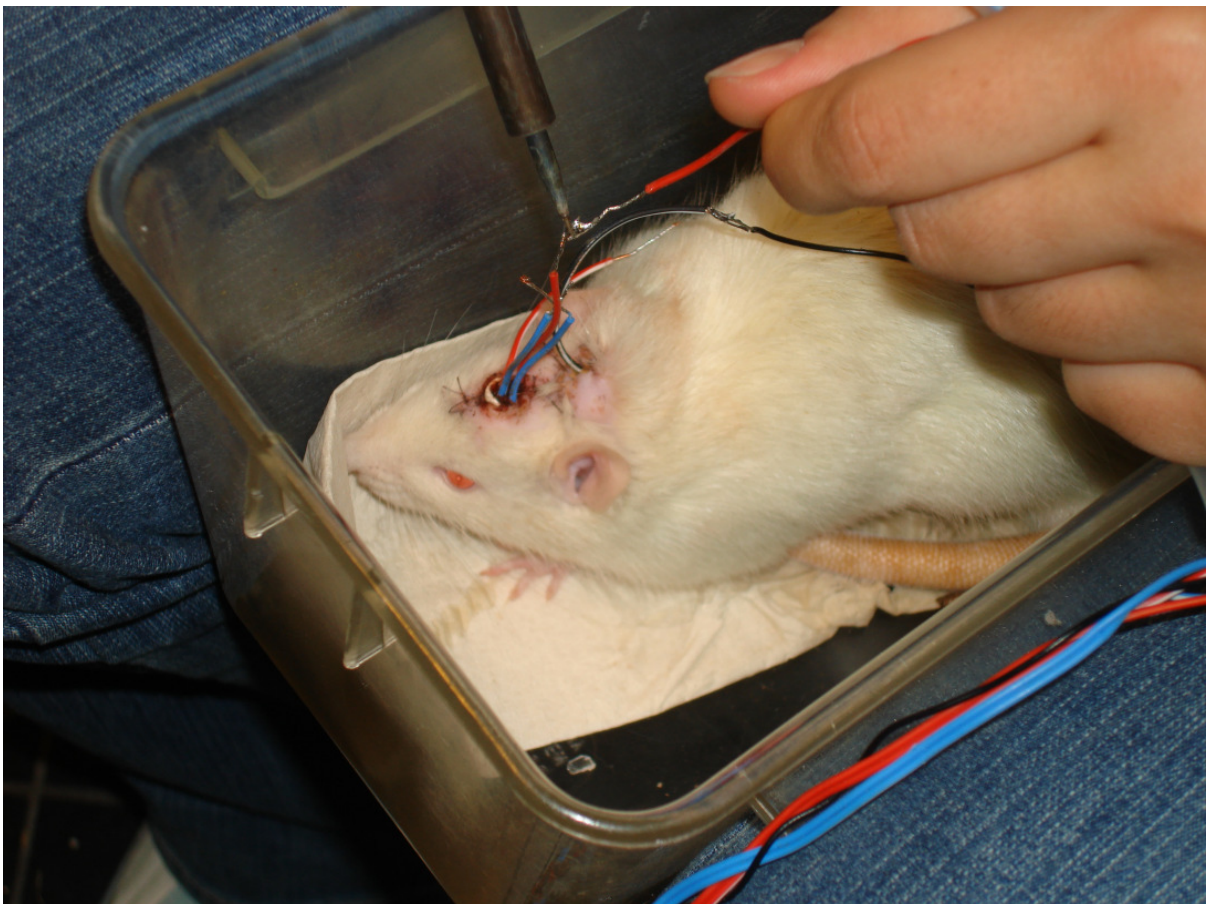


Abbildung 7: Anschließen der Tiere an den Verstärker.
Quelle: Corinna Mühleib

So konnte ein EEG in Echtzeit abgeleitet werden. Die Versuchstiere wurden in einen durchsichtigen Plastik Käfig gesetzt und so in der Ganzfeldkugel platziert. Die visuellen Stimuli, generiert vom Computersystem EP2000 (Bach, 2000 (3)), wurden auf einem Videomonitor präsentiert, der in circa 15 cm Entfernung zum Tier stand. Durch diese Konstruktion, die in Abbildung 8 dargestellt ist, konnte das Tier ohne Narkose, freibeweglich in seinem Käfig, in jeder Blickrichtung die visuellen Reize wahrnehmen. Die maximale Stimulus-Helligkeit lag dabei bei 38 cd/m².

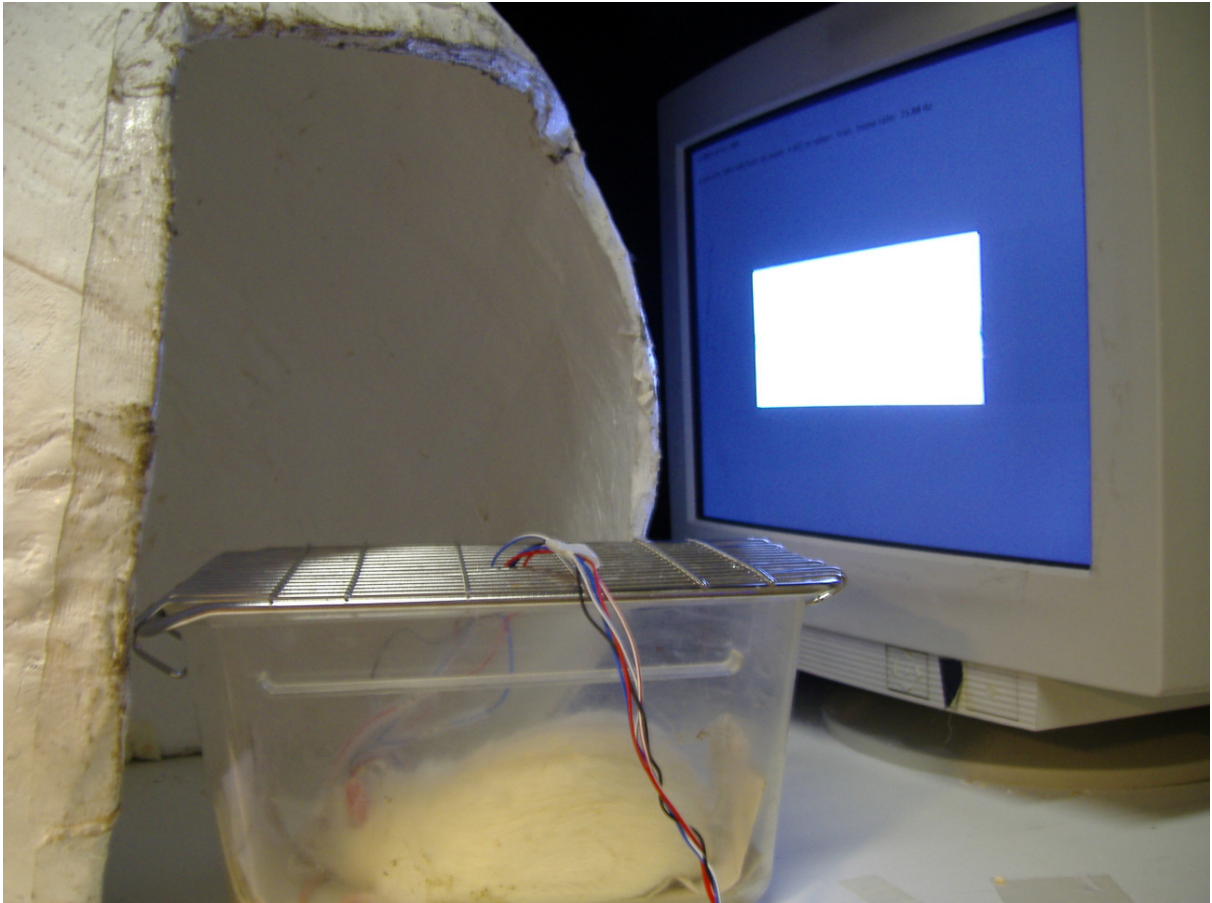


Abbildung 8: Aufbau zur Ableitung der visuell evozierten Potentiale. Die Ratte sitzt mit den angeschlossenen Elektroden in einem durchsichtigen Plastikkäfig. Dieser wird in der Ganzfeldkugel, hier links im Bild, platziert und diese dann direkt vor den Monitor gerückt.
Quelle: Corinna Mühleib

Vier Serien mit unterschiedlichen Reizen wurden jeweils zweimal gemessen. Die Signale wurden verstärkt und mittels Bandpass gefiltert. Bandpassfilterung bewirkt, dass nur Signale in einem bestimmten vorher festgelegten Frequenzbereich aufgenommen werden. So werden physiologische EEG-Potentiale von Artefakten getrennt. Diese Art von Filterung ist bei Evozierten Potentialen üblich, da eine starke Verstärkung des sehr niedrigen Biosignals zur Aufzeichnung nötig ist. Die hohe Verstärkung führt zu einer erheblichen Störanfälligkeit durch von außen eingestreute

Spannungsschwankungen. In dem hier beschriebenen Versuch setzte ein Ausschaltmechanismus ein, wenn Frequenzen niedriger waren als 5 Hz oder höher als 300 Hz. So wurde zum Beispiel auch die Aufzeichnung und somit Fehlmessungen bei einem Tier verhindert, das schlief bzw. die Augen für längere Zeit geschlossen hielt, oder wenn starke Bewegungsartefakte vorlagen.

Es wurden Potentiale mit stationären Reizen evoziert. Dazu sahen die Tiere zum einen eine Serie von Lichtblitzen mit Frequenzen von 2,9 Hz, 4,7 Hz, 7,5 Hz, 12,5 Hz, 19 Hz und 38 Hz und zum anderen eine Serie von Lichtflickern mit einmal 7,5 Hz und einmal 19 Hz. Die Helligkeitsunterschiede betragen dabei 5 %, 10 %, 20 %, 40 % und 80 %. Bei Lichtblitzen folgt auf eine kurze helle Phase (10 ms) eine längere dunkle Phase (frequenzabhängig), wohingegen sich Lichtflicker dadurch auszeichnen, dass die Phase von hell und dunkel gleich lang ist.

Transiente Potentiale wurden durch einen niedrigfrequenten On-Stimulus mit 1,9 Hz und 38 cd/m² hervorgerufen.

Die Anzahl von Durchläufen lag im Schnitt zwischen 40 und 80 und war abhängig von der Stimulationsfrequenz. Um das Hintergrundrauschen zu quantifizieren, liefen zusätzlich einige Zyklen ohne visuellen Stimulus.

Parallel zur Messung wurden die visuell evozierten Potentiale digitalisiert und die Ergebnisse in Echtzeit auf dem Monitor des Untersuchers angezeigt. So konnte noch während der Messung die Aufnahmequalität des EEG und der VEPs kontrolliert werden.

Abschließend erfolgte die Auswertung der stationären Potentiale mittels Fourier Analyse mit der IgorPro5.01 Software (Bach und Meigen, 1999). Bei der Fourier Analyse wird das EEG-Signal in seine Frequenzkomponenten zerlegt. Für jede einzelne Komponente werden Amplitude und Phase bestimmt. Durch die 1966 von Regan erfundene Auswerteapparatur kann das EEG direkt proportional zur Reizfrequenz online über mehrere Tiefpassfilter abgeleitet werden. Durch die Multiplikation des EEG Signals mit Sinus und Kosinus der Reizfrequenz kann die Amplitude des Potentials bei der jeweiligen Stimulationsfrequenz gemessen werden. Der Vorteil dieser Methode ist die rasche Aussage über die Amplitude. Der Nachteil ist, dass die Latenz nur indirekt gemessen werden kann. Dazu muss die Phasenverschiebung des Potentials bei verschiedenen Reizfrequenzen ermittelt werden.

Zur Bestimmung der Latenzen wurde deshalb die Auswertung der transienten Potentiale verwendet. Dabei werden Signale, die immer zu einem festen Zeitpunkt

auftreten, durch elektronische Mittelung mehrerer Kurvenausschnitte aus der Hintergrundaktivität extrahiert. Die Latenz ergab sich dabei als Zeitraum vom Stimulationsbeginn bis zum darauf folgenden Ausschlag (P1 und N1).

4.8 Blutentnahmen

4.8.1 Schwanzvenenblutentnahme

Die Schwanzvenenblutentnahme erfolgte eine Woche vor und jeweils zwei und vier Wochen nach Immunisierung.

Vor der Blutentnahme aus der Schwanzvene wurden die Tiere einzeln circa 10 bis 15 min unter einer Infrarotlampe erwärmt. So wurde die Durchblutung in den peripheren Regionen, die der Wärmeregulation dienen, gesteigert. Zu diesen Regionen gehört bei Ratten auch der Schwanz. Es kam so zur Dilatation der Gefäße, was die Punktion deutlich erleichterte.

Danach wurden die Tiere in eine Rattenblutentnahmehalterung gesetzt, diese verschlossen und am Dreibeinstativ befestigt. Die Rattenblutentnahmehalterung ist eine Röhre aus Plexiglas mit einer Öffnung am Boden, durch welche der Schwanz gesteckt werden konnte. Durch einen Spalt längs der oberen Öffnung, konnte dieser individuell nach Tiergröße mit einem Schraubdeckel verschlossen werden. Die Ratte war in ihrer Bewegungsfreiheit so eingeschränkt, dass sie sich nicht mehr um die Körperachse drehen oder den Schwanz um mehr als 0,5 cm zurückziehen konnte. Es musste jedoch genug Raum bleiben, um eine uneingeschränkte Atmung des Tieres zu gewährleisten.

Der Rattenschwanz wurde mit warmem Wasser und Kleenextüchern gesäubert. Zusätzlich kam es dadurch zu einer weiteren Dilatation der Schwanzvenen, die sich so noch besser erkennen ließen. Mit der linken Hand wurde der Schwanz in einer guten Position fixiert und mit der rechten Hand erfolgte die Punktion einer Schwanzvene mit einer 26 Gauge dicken Nadel auf einer 1 ml Spritze. Nach der Entnahme wurde die Blutung durch sanfte Kompression mit den Fingern zum Stillstand gebracht.

In der Abbildung 9 ist die Schwanzvenenblutentnahme zu sehen.



Abbildung 9: Schwanzvenenpunktion einer Ratten in der Rattenblutentnahmehalterung.
Quelle: Corinna Mühleib

Jedem Tier wurde ungefähr 1 ml Blut entnommen. Somit wurde das zirkulierende Blutvolumen nie in einer die Tiere beeinträchtigenden Weise gesenkt (Diehl et al., 2001). Die Tiere konnten unmittelbar nach der Blutentnahme ohne Beeinträchtigungen des Kreislaufes in ihrer Käfige zurückgesetzt werden.

Das abgenommene Blut wurde in 1,5 ml Reaktionsröhrchen umgefüllt und erst 30 min auf Eis gelagert. Danach wurde es in der kühlbaren Zentrifuge bei 14.000 Umdrehungen pro Minute für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Serum wurde in ein weiteres Reaktionsröhrchen abpipettiert und dann bei -80 °C eingefroren.

4.8.2 Herzpunktion

Die Herzpunktion wurde fünf Wochen nach Immunisierung durchgeführt.

Vor der Herzpunktion wurden die Tiere in eine tiefe Narkose mittels Isofluran versetzt. Bei erloschener Reaktion auf Schmerzreize wurde das Herz mit einer 22 Gauge Nadel auf einer 3 ml Spritze punktiert. Zum Auffinden der richtigen Punktionsstelle legte man das stark narkotisierte Tier auf den Rücken und brachte

die vorderen Extremitäten in Lebendstellung. Eine gedachte Linie zwischen den Ellenbogen ergab die richtige Höhe der Punktionsstelle. Punktiert wurde ca. 0,3 cm unterhalb dieser Linie parasternal links 1 bis 1,5 cm tief. Es konnten 8 bis 10 ml Blut entnommen werden. Nach der Herzpunktion erlosch der Herzschlag und der Kreislauf kam zum Stillstand. Dadurch war die Ratte devitalisiert.

Das Blut wurde ebenfalls in 1,5 ml Reaktionsröhrchen umgefüllt und für 30 min auf Eis gelagert. Danach wurde es in der kühlbaren Zentrifuge bei 14.000 Umdrehungen pro Minute für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Serum wurde in weitere Reaktionsröhrchen abpipettiert und dann bei -80 °C eingefroren.

4.9 Kammerwasserentnahme

Direkt nach Eintreten des Todes erfolgte die Kammerwasserentnahme. Dazu wurde mit einer feinen chirurgischen Pinzette die Kornea der Augen fixiert und mit einer 10 µl Hamiltonspritze und der dazugehörigen sehr feinen Nadel die Vorderkammer punktiert. Die durchschnittlich gewonnenen 10 µl Kammerwasser wurden in ein 0,5 ml Reaktionsröhrchen umgefüllt und dann bei -80 °C eingefroren.

4.10 Organentnahmen

Für weitere Untersuchungen wurden den Ratten die Augen entnommen. So können in künftigen Studien noch histologische Untersuchungen der Retinae und der Sehnerven durchgeführt werden. Des Weiteren wurden auch die Gehirne der Tiere entnommen, um Schnitte anzufertigen und diese histologisch auf eventuelle Entmarkungsherde zu untersuchen. Die unterschiedlichen Präparate wurden in verschiedenen Fixierungslösungen gelagert.

4.10.1 Herstellung der Fixierungslösungen

Zur Herstellung der vierprozentigen Formaldehydlösung wurden 4 g des pulverförmigen Paraformaldehyd mit 100 ml PBS in einem Erlenmeyerkolben gelöst und auf der Heizplatte unter dem Abzug bis zum Aufklaren aufgeköcht.

Die vierprozentige Formalinlösung wurde nach dem entsprechenden Mischverhältnis aus einer gesättigten Formalinlösung (4 ml) und PBS (96 ml) angemischt.

Die Aufbewahrung der Lösungen erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C in einer mit Aluminiumfolie umwickelten Schraubdeckelflasche.

4.10.2 Augen- und Sehnerv-Entnahme

Nach Durchführung von Herzpunktion und Kammerwasserentnahme erfolgte die Enukeation beider Augen der Tiere. Zuerst wurde der laterale Augenwinkel mit einem circa 2 cm langen Schnitt erweitert. Mit einer chirurgischen Pinzette wurde der Bulbus leicht angehoben und fixiert. So konnte er mit einer feinen Präparierschere vom umgebenden Binde- und Fettgewebe und den Augenmuskeln befreit werden. Besondere Vorsicht galt beim Präparieren dem Sehnerv, da dieser noch in möglichst großer Länge am Auge verbleiben sollte. Meist war eine Länge von 3 bis 4 mm zu erhalten. Unter dem Operationsmikroskop wurde der restliche Sehnerv einschließlich seines Kopfes vom Auge getrennt. Die Augen wurden zwei Stunden in der vierprozentigen Paraformaldehydlösung fixiert, die Sehnerven 24 Stunden in vierprozentigem Formalin. Nach der Fixierung wurden sowohl die Augen als auch die Sehnerven in PBS umgelagert. Die Lagerung erfolgte gekühlt bei circa 7 °C.

Aus den fixierten Augen wurden zu einem späteren Zeitpunkt Flachpräparate der Retinae angefertigt, um sie mit Brn-3a-Antikörpern, einer spezifischen Färbung für retinale Ganglienzellen zu behandeln. Unter dem Mikroskop sollten in verschiedenen Gesichtsfeldern retinale Ganglienzellen ausgezählt und Unterschiede zwischen den Gruppen beurteilt werden. Allerdings hat der Antikörper nicht gebunden und die Auszählung war somit nicht möglich.

4.10.3 Gehirnentnahme

Zur Gehirnentnahme wurde ein 4 bis 5 cm langer quer verlaufender Hautschnitt im Genickbereich der Ratten gemacht. Mit Hilfe einer Rippenschere wurde das Rückenmark auf dieser Höhe durchtrennt. Ausgehend von dem so gewonnenen Eingang in den Wirbelkanal, wurde die Schädeldecke jeweils temporalseitig rechts und links mit einer starken Präparierschere eingeschnitten. So konnte diese mit leichtem Hebeln und etwas Kraft abgehoben und nach vorne umgeklappt werden. Das so freigelegte Gehirn wurde mit einer stumpfen, feinen Pinzette vorsichtig aus der Schädelkapsel gelöst und entnommen. Dann erfolgte die Fixierung des Gehirns in vierprozentigem Formalin. Die Lagerung erfolgte in der Fixierungslösung gekühlt bei circa 7 °C.

4.11 Untersuchung der entnommenen Gehirne

4.11.1 Paraffineinbettung

Zur Paraffineinbettung wurden die fixierten Gehirne zur Entfernung der Fixierungslösung viermal 30 Minuten in PBS gewaschen. Danach folgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Dazu wurden die Gewebeproben jeweils zweimal für 45 min in siebzigprozentigem, achtzigprozentigem und neunzigprozentigem Ethanol inkubiert. Als so genanntes Intermedium zwischen dem wasserlöslichen Ethanol und dem nicht wasserlöslichen Paraffin diente das Xylol, in dem die Präparate auch zweimal für 45 min inkubiert wurden. Anschließend wurden die Proben zur Besserung der Durchtränkung für 30 min bei 60 °C in ein 1:1 Xylol-Paraffin-Gemisch überführt. Danach fand eine Inkubation zunächst für eine Stunde in Paraffin bei 60 °C und dann über Nacht unter den gleichen Bedingungen statt. Zum Einbetten wurde eine geringe Menge Paraffin in eine Aluminiumform gegossen, so dass der Boden der Form gerade benetzt war. Nach dem Einlegen des Gewebes wurde die Form vollständig mit Paraffin gefüllt und bei Raumtemperatur abgekühlt. Die Paraffinblöcke wurden bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

4.11.2 Paraffinschnitte

Für die Anfertigung von histologischen Paraffinschnitten wurden die Gewebeproben in Paraffin auf Holzblöcken befestigt und in die vorgesehene Halterung eines Schlittenmikrotoms eingespannt. Die circa 6 µm dicken Gewebescheiben wurden in warmes autoklaviertes Wasser überführt und auf einen Objektträger aufgenommen. Die Trocknung erfolgte zunächst für 30 min bei 60 °C und anschließend über Nacht bei 37 °C. Für die Beurteilung der Gewebemorphologie und um eine bessere Orientierung möglich zu machen, wurden mehrere Frontalschnitte der Gehirne angefertigt.

4.11.3 Färbung der Schnitte

Die Schnitte wurden mit 96-prozentigem Alkohol entparaffiniert und danach im Wärmeschrank bei 60 °C für 16 bis 24 Stunden in Luxol Fast Blue-Lösung inkubiert. Diese Lösung setzt sich aus 1 mg Luxol Fast Blue und 100 ml 95-prozentiger Ethanol-Essigsäure zusammen. Dann wurden sie in 96-prozentigem Ethanol und danach noch mit destilliertem Wasser kurz gewaschen. Anschließend wurden sie mit

0,05-%igem Lithiumcarbonat (Li_2CO_3) für 1 min nachfixiert und nochmals für 20 bis 30 Sekunden mit siebzigprozentigem Ethanol gewaschen. Dieser Schritt diente der Nachdifferenzierung und man wartete kurz bis die graue Substanz sichtbar wurde. Danach wurde erneut kurz mit destilliertem Wasser gespült. Als nächster Schritt folgte eine Inkubation der Schnitte für 5 bis 7 min in zweiprozentigem Kresylviolett. Nach einer weiteren kurzen Spülung mit Wasser durchliefen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe, bevor sie eingedeckelt wurden. Durch die Luxol Fast Blue und Kresylviolettfärbung wurden die Markscheiden türkisblau und die Zellkerne blauviolett angefärbt.

4.11.4 Mikroskopische Beurteilung der Hirnschnitte

Die Beurteilung der Schnitte erfolgte unter dem Mikroskop bei zehnfacher, zwanzig- und vierzigfacher Vergrößerung. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf der mit MBP immunisierten Gruppe. An den bekannten Prädilektionsstellen für die Lokalisation der Plaques wurde im Speziellen auf entzündliche Infiltrate und Entmarkungsherde geachtet. Diese sind Balken, Hirnstamm, insbesondere Brücke mit Augenmuskelkernen, Kleinhirn, Kleinhirnstiele, die Pyramidenbahn auf jedem Niveau, der Boden des IV. Ventrikels und die Hinterstränge des Rückenmarks. Seltener sind Hirnrinde, Basalganglien und Rückenmarksgrau betroffen (Poeck und Hacke, 2001b).

4.12 Statistische Verfahren

Zur Auswertung der verschiedenen oben beschriebenen Methoden wurden unterschiedliche statistische Verfahren verwendet. Diese sollen an dieser Stelle kurz dargestellt werden. Alle Datenanalysen erfolgten mit Hilfe der Tabellenkalkulationsprogramme EXCEL und SPSS (Microsoft).

Mittelwert und Streuungsmaße

Der arithmetische Mittelwert beschreibt den Schwerpunkt einer Messreihe, wobei jeder einzelnen Beobachtung das gleiche Gewicht zukommt. Von Ausreißerwerten ist er also stark beeinflusst, aber bei symmetrischen, eingipfeligen Verteilungen ist seine Verwendung sehr sinnvoll. Er hat die gleiche Maßeinheit wie die gemessenen Werte und errechnet sich aus der Summe aller einzelnen Stichproben dividiert durch die Stichprobenanzahl.

Streuungsmaße quantifizieren die Abweichungen der Stichprobenwerte vom Mittelwert. Die Varianz ist die mittlere quadratische Abweichung der Daten vom Mittelwert. Wegen ihrer quadratischen Dimension ist die Varianz sehr schwer zu interpretieren, weshalb man auf die Standardabweichung zurückgreift.

Die Standardabweichung ist die Wurzel aus der Varianz und ein Streuungsmaß mit der gleichen Dimension wie die gemessenen Stichprobenwerte. Sie stellt ein Maß für die Homogenität bzw. Heterogenität der Stichproben dar. Je größer die Standardabweichung, desto heterogener sind die einzelnen Stichproben.

Der Standardfehler des Mittelwertes ist ein Streuungsmaß für den Mittelwert einer Messreihe. Er gibt die Abweichung des Mittelwertes einer Stichprobe vom Erwartungswert an.

T-Test

T-Tests sind statistische Verfahren für den Nachweis eines Einflusses auf die Messwerte für abhängige Stichproben. Es erfolgt ein Vergleich eines Erwartungswertes gegen einen festen Wert.

ANOVA = Varianzanalyse

ANOVA-Verfahren untersuchen, ob und wie sich die Erwartungswerte der metrischen Zufallsvariablen in den verschiedenen Gruppen unterscheiden. Es wird die Frage untersucht, ob die Varianz zwischen den Gruppen größer ist, als die Varianz innerhalb der Gruppen. Somit können signifikante Unterschiede herausgefunden werden. Man unterscheidet dabei parametrische und nicht-parametrische Verfahren. Für die parametrischen Verfahren müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein. Es muss eine Varianzhomogenität der Stichproben vorliegen und eine Normalverteilung der Stichprobenvariablen. Bei den nicht-parametrischen Tests müssen diese Bedingungen nicht erfüllt sein. Sie sind also robuster, aber auch weniger genau. Bei den verschiedenen ANOVA-Verfahren handelt es sich um Omnibustests, bei denen das gesamte Datenmaterial unspezifisch auf einmal getestet wird. Ergibt sich hier Signifikanz, werden noch so genannte Post-Hoc Tests angeschlossen, die zum Teil schärfer sind und genauere Ergebnisse bringen. Ihre Durchführung bei vorher verfehlter Signifikanz ist nicht erlaubt.

Tukey Kramer Verfahren = Tukey Kramer HSD

Das Tukey Kramer Verfahren ist eine statistische Methode, die zum Prüfen einfacher paarweiser Hypothesen dient. Mittels dieses Tests wird eine sogenannte Prüfgröße, auch p-Wert genannt, errechnet. Mit diesem p-Wert kann das Signifikanzniveau bestimmt werden.

5. Ergebnisse

5.1 Studienablauf und Versuchstiere

Die Studie wurde an 42 Lewisratten durchgeführt. Dabei wurden der GFAP-, der MBP- und der Kontrollgruppen jeweils zehn Tiere und der Sehnerv-Gruppe zwölf Tiere zugeteilt.

Während der Studie entwickelten vier Tiere einen Hornhautdefekt. Insgesamt war aus jeder Gruppe ein Tier betroffen, am stärksten das aus der Kontrollgruppe. Das Wohlbefinden der Tiere und der Untersuchungsablauf waren dadurch nicht beeinträchtigt.

Nach zwei Wochen wurden zwei Ratten aus der Sehnerv-Gruppe planmäßig vorzeitig getötet. Zwei Tiere der MBP-Gruppe verstarben außerplanmäßig. Eines verstarb bei einer Blutentnahme und eines auf Grund zu tiefer Narkose. Somit konnten zum Schluss jeweils zehn Tiere der GFAP-, der Sehnerv- und der Kontrollgruppen und acht Tiere der MBP-Gruppe ausgewertet werden.

5.2 Augeninnendruck

Die Augeninnendruckmessung konnte bei allen Tieren zu den geplanten Zeitpunkten vormittags eine Woche vor, sowie zwei und vier Wochen nach Immunisierung durchgeführt werden. Es wurden jeweils zehn Werte pro Augen gemessen, deren Durchschnittswerte im Bereich von 11,5 mmHg bis 13,3 mmHg lagen.

Die gemessenen Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

	GFAP	MBP	Sehnerv	Kontrolle
Ausgangspunkt (AP)				
Mittelwert AP [mmHg]	12,57	12,39	12,57	12,51
Standardabweichung AP	0,65	0,36	0,69	0,63
2 Wochen (2W)				
Mittelwert 2W [mmHg]	12,02	11,91	12,08	12,19
Standardabweichung 2W	0,41	0,23	0,50	0,43
4 Wochen (4W)				
Mittelwert 4W [mmHg]	12,12	12,19	12,33	11,96
Standardabweichung 4W	0,42	0,32	0,43	0,41

Tabelle 2: Mittelwerte der Augeninnendruckmessung in mmHg und Standardabweichungen aller Gruppen zu den drei verschiedenen Untersuchungszeitpunkten.

Es wurde ein durchschnittlicher Augeninnendruck von $12,57 \pm 0,65$ mmHg für die Tiere der GFAP-Gruppe, von $12,39 \pm 0,36$ mmHg für die Tiere der MBP-Gruppe, von $12,57 \pm 0,69$ mmHg für die Tiere der Sehnerv-Gruppe und von $12,51 \pm 0,63$ mmHg für die Kontrollgruppe zum Ausgangszeitpunkt, also noch vor Immunisierung, gemessen. Zwei Wochen nach Immunisierung lag der Mittelwert des Augeninnendrucks für die mit GFAP immunisierten Ratten bei $12,02 \pm 0,41$ mmHg, bei den MBP-Ratten bei $11,91 \pm 0,23$ mmHg, bei den Sehnerv-Ratten bei $12,08 \pm 0,5$ mmHg und bei den Kontrolltieren bei $12,19 \pm 0,59$ mmHg. Vier Wochen nach Immunisierung ergeben sich Werte von $12,12 \pm 0,42$ mmHg für die GFAP-Gruppe, von $12,19 \pm 0,32$ mmHg für die MBP-Gruppe, von $12,33 \pm 0,43$ mmHg für die Sehnerv-Gruppe und von $11,96 \pm 0,41$ mmHg für die Kontrollgruppe.

Die Standardabweichungen lagen für alle Gruppen zu allen Zeitpunkten zwischen 0,23 und 0,69 und waren somit immer kleiner 1. Als Maß für die Abweichung der Einzelwerte einer Messreihe von ihrem arithmetischen Mittelwert belegen die Standardabweichungen somit homogene Ergebnisse ohne große Schwankungsbreite.

Die Abbildung 10 zeigt die Mittelwerte des Augeninnendrucks der vier Gruppen zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten.

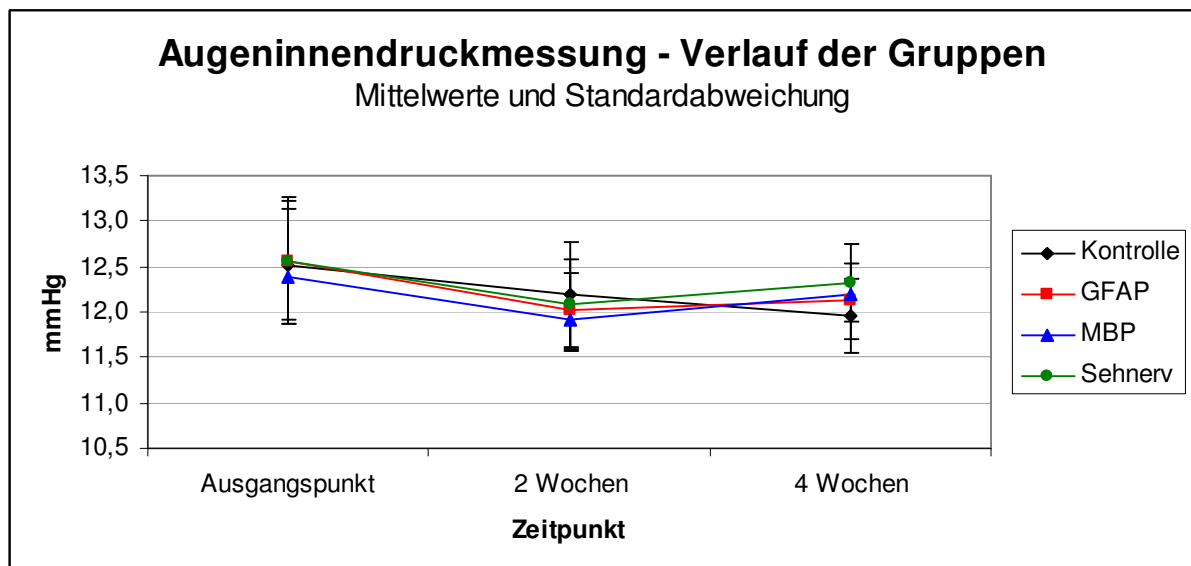


Abbildung 10: Es sind die Mittelwerte des Augeninnendrucks der vier Gruppen (Kontroll-, GFAP-, MBP- und Sehnerv-Gruppe) mit der Standardabweichung zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten (Ausgangszeitpunkt, zwei und vier Wochen nach Immunisierung) aufgetragen.

In der Abbildung 11 werden die Mittelwerte des Augeninnendrucks gegen die verschiedenen Gruppen aufgetragen. So sind die verschiedenen Zeitpunkte besser miteinander zu vergleichen.

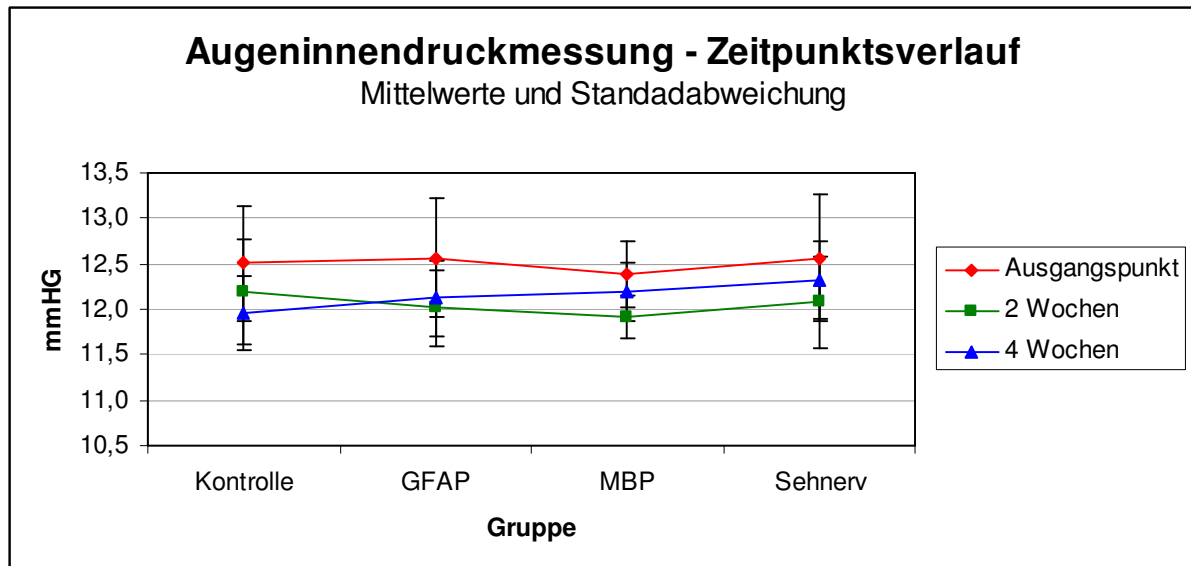


Abbildung 11: Es sind die Mittelwerte des Augeninnendrucks zu den verschiedenen Zeitpunkten (Ausgangszeitpunkt, zwei und vier Wochen nach Immunisierung) mit der Standardabweichung gegen die vier Gruppen (Kontroll-, GFAP-, MBP- und Sehnerv-Gruppe) aufgetragen. So kann der zeitliche Verlauf besser beurteilt werden.

Aus den Abbildungen 10 und 11 ist zu erkennen, dass die Werte der verschiedenen Gruppen und zu den unterschiedlichen Zeitpunkten keine auffälligen Unterschiede zeigen.

Die statistische Post-Hoc Analyse mit Tukey`s HSD Test erbrachte keine signifikanten Abweichungen über den gesamten Studienzeitraum (siehe Anhang), da die p-Werte stets über 0,05 lagen und bestätigten so die absoluten Zahlenwerte.

Zusammenfassend lieferten die Messungen sowohl zwischen den einzelnen Gruppen, als auch zwischen den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten, keinen signifikanten Unterschied. Es hat kein signifikanter Anstieg oder Abfall des intraokulären Druckes im gesamten Studienzeitraum von fünf Wochen stattgefunden.

5.3 Fundusuntersuchung

Die Fundusuntersuchung mit Fotodokumentation fand eine Woche vor Immunisierung, sowie zwei und vier Wochen nach Immunisierung statt.

Alle Tiere vertrugen die verabreichten Narkosemittel und das Mydriatikum gut. Die Tiere waren für die Untersuchung in ausreichend tiefer Narkose und nach dem Aufwachen zeigten sich keinerlei Beschwerden. Die Dilatation der Pupillen war während der Untersuchung optimal und bildete sich spätestens bis zum nächsten Morgen wieder vollständig zurück.

Bei allen Tieren, auch bei Tieren mit Hornhautdefekt, war die Fundusuntersuchung zu den genannten Zeitpunkten möglich und sowohl die Papille, als auch die Gefäße waren zu allen Zeitpunkten und in allen Gruppen gut zu beurteilen.

Zur Photodokumentation wurden bei allen Tieren mindestens drei Bilder pro Auge angefertigt und archiviert. Bei den wenigen Tieren mit Hornhautdefekt, der sich als Trübung der Kornea zeigte, war die bildliche Dokumentation des Augenhintergrundes jedoch teilweise erschwert. Bei diesen Tieren wurden auch die Korneadefekte photographisch dokumentiert. In Abbildung 12 ist diese doppelte Dokumentation für ein Tier der Kontrollgruppe beispielhaft dargestellt. Dieses Tier war am stärksten und an beiden Augen betroffen.

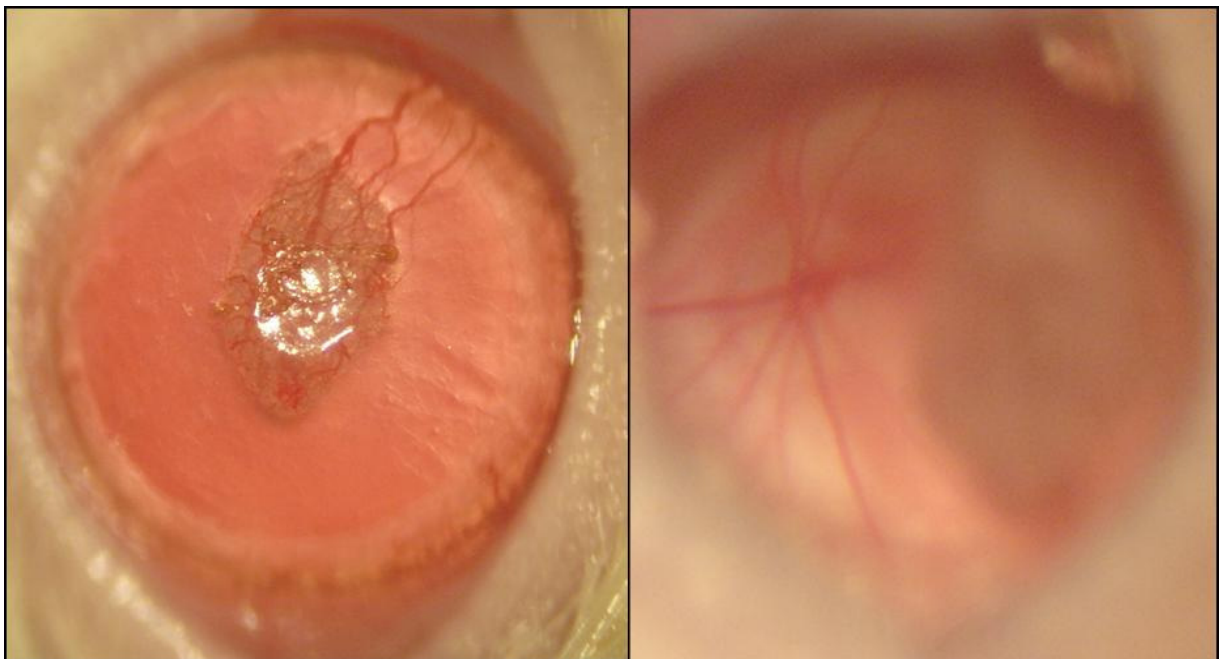


Abbildung 12: Die Aufnahmen zeigen beide das rechte Auge eines Tieres der Kontrollgruppe vier Wochen nach der Immunisierung. Im linken Bild wird der Korneadefekt dokumentiert. Das rechte Bild zeigt die Dokumentation des Fundus bei geringfügig eingeschränkter Einsicht auf die Papille.

Quelle: Corinna Mühleib

Die Papille jedes einzelnen Auges jedes Tieres wurde auf Größe, Form und Exkavationstiefe beurteilt. Darüber hinaus wurden Gefäßeinsprossungen und retinale Randblutungen beurteilt. Alle diese Abnormalitäten waren zu keinem Zeitpunkt bei einem Tier vorzufinden.

Abbildung 13 zeigt den Fundus eines Tieres zu den drei Untersuchungszeitpunkten, eine Woche vor, sowie zwei und vier Wochen nach Immunisierung. Diese Abbildung ist beispielhaft für alle Tiere, denn am Augenhintergrund keines Tieres waren Veränderungen sichtbar.

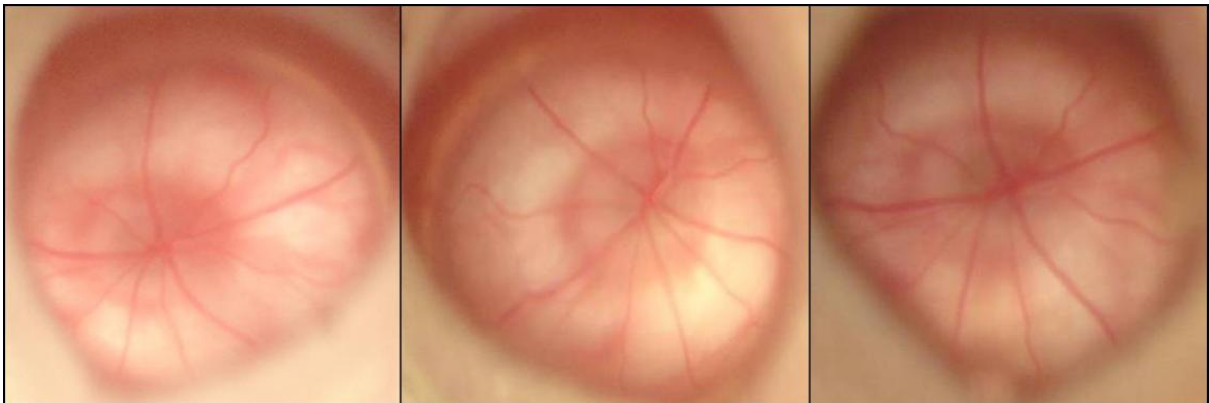


Abbildung 13: Der Fundus des rechten Auges eines Tieres der Sehnerv-Gruppe zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten: links ist die Aufnahme zum Ausgangszeitpunkt, eine Woche vor Immunisierung, in der Mitte die Aufnahme zwei Wochen nach Immunisierung und rechts die Aufnahme vier Wochen nach Immunisierung abgebildet. In keiner der Aufnahmen sind Veränderungen am Fundus sichtbar.

Quelle: Corinna Mühleib

5.4 Visuell evozierte Potentiale

5.4.1 Allgemeines

Visuell evozierte Potentiale wurden bei allen Tieren fünf Wochen nach Immunisierung an zwei aufeinander folgenden Tagen gemessen. Die Implantation der zur VEP-Messung notwendigen Elektroden fand zwei Tage vor der VEP-Durchführung statt, gefolgt von einer zweitägigen Ruhepause. Die zur Implantation der Elektroden notwendige Isofluran-Narkose wurde von allen Tieren mit einer Ausnahme gut vertragen. Keines der Tiere zeigte im Bereich der Elektroden Entzündungsreaktionen und es kam nicht zu Explantationen durch die Tiere selbst. Bei allen Tieren konnten zu den geplanten Zeitpunkten visuell evozierte Potentiale gemessen und ausgewertet werden. Zu jeder Zeit konnten das gerade ablaufende Programm und die Potentialverläufe am Untersucher-Monitor nachvollzogen werden. Die Abbildung 14 zeigt den Untersucher-Monitor während einer Messung.

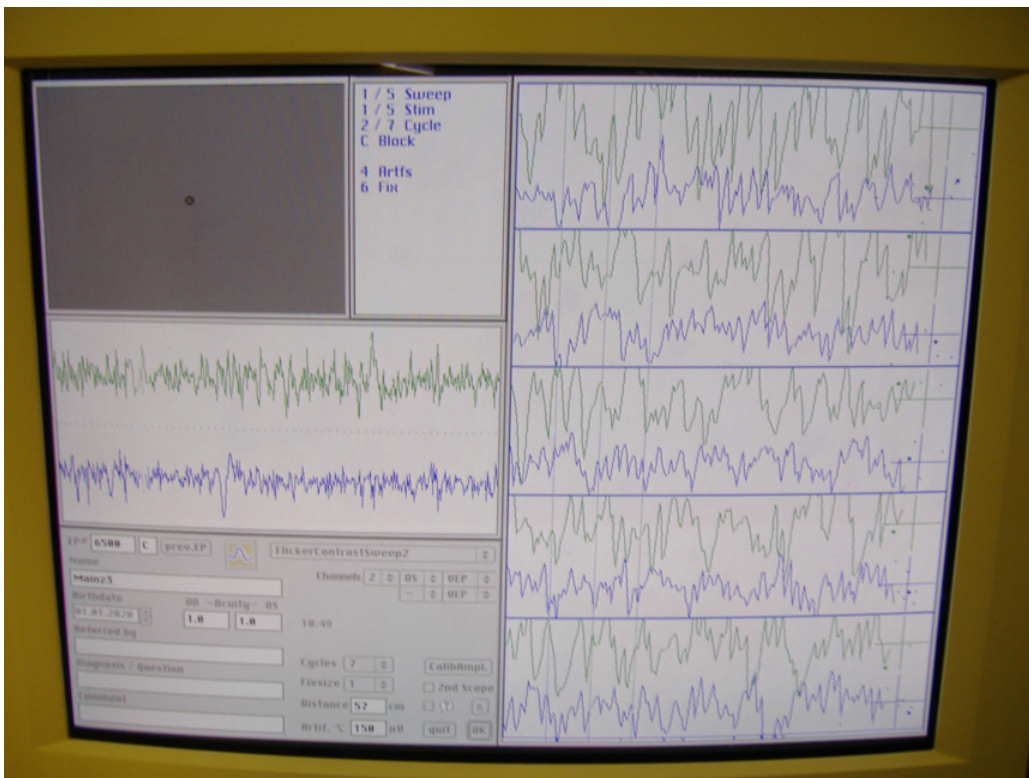


Abbildung 14: Am Untersuchermonitor wurden schon während der Messung die Potentialverläufe beobachtet, um Vorkommnisse, wie zum Beispiel ein Einschlafen des Tiers oder Kabelprobleme direkt bemerken und beheben zu können.
Quelle: Corinna Mühleib

5.4.2 Transiente visuell evozierte Potentiale

Das Einzelflickerprogramm mit einem On-/Off-Flicker bei einer Frequenz von 1,9 Hz gehört zu den so genannten transienten visuell evozierten Potentialen. Transiente Potentiale sind durch eine positive und eine negative Komponente gekennzeichnet. Die Ergebnisse des Programms wurden sowohl hinsichtlich der Latenzzeit als auch hinsichtlich der Amplituden ausgewertet.

Dazu wurden zum einen die Zeit bis zum ersten positiven und zum anderen die Zeit bis zum ersten negativen Ausschlag in der On-Phase, also der Phase mit Licht, berechnet. Dasselbe wurde für die Off-Phase, der Phase ohne Licht, wiederholt. Des Weiteren wurden die Amplituden der On- und der Off-Phase berechnet, in dem die Differenz der maximalen Amplitude beim positiven und der maximale Amplitude beim negativen Ausschlag gebildet wurde.

In der Abbildung 15 sind der Programmverlauf, der typische Potentialverlauf und die ausgewählten Messpunkte schematisch dargestellt.

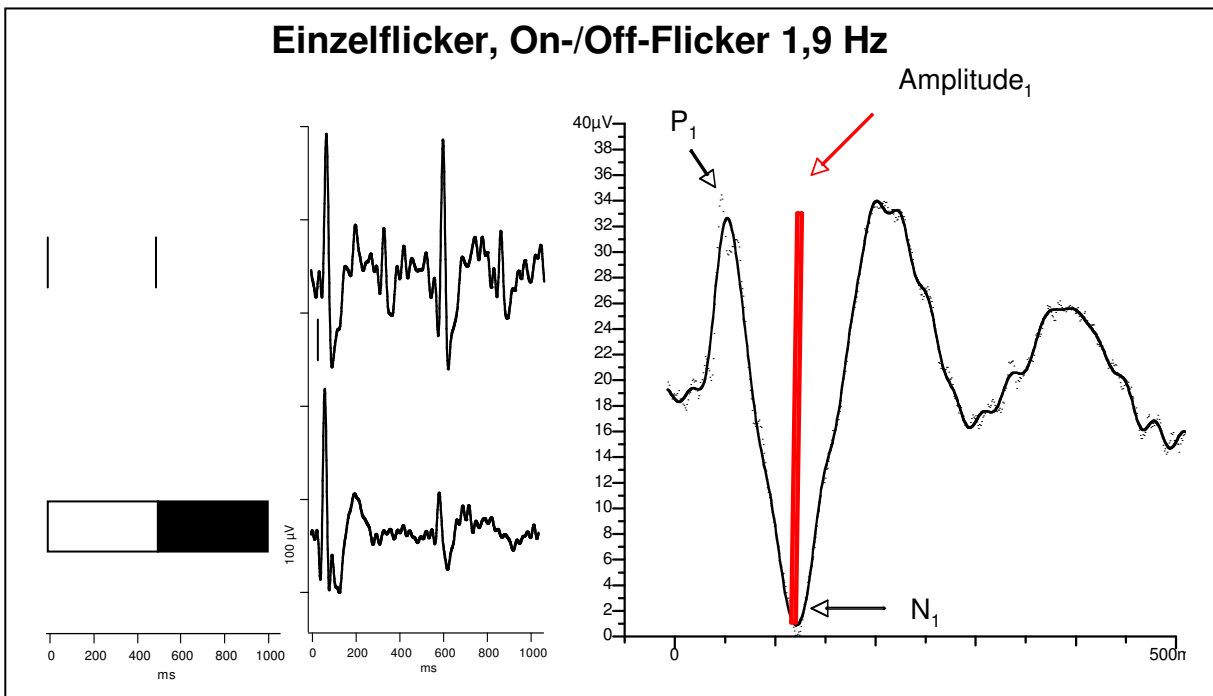


Abbildung 15: Links ist der typische Programmverlauf des Einzelflickerprogramms mit einem beispielhaften Potentialverlauf dargestellt. Rechts ist der Verlauf eines Potentials schematisch abgebildet. P₁ kennzeichnet den ersten positiven Ausschlag und N₁ den ersten negativen. Dies sind die in dieser Arbeit ausgewerteten Messpunkte. Der rote Strich zeigt die Amplitude des Potentials zwischen P₁ und N₁.

Die Latenzzeiten wurden in ms gemessen, die Amplituden in μV . Die Werte für jedes Tier wurden gemittelt und dann für jede Gruppe Mittelwerte, Standardabweichung und Standardfehler bestimmt.

5.4.2.1 Latenzzeiten in der On-Phase

Die Latenzzeit bis zum ersten positiven Ausschlag belief sich für die Kontrolltiere im Mittel auf $55,76 \pm 0,73$ ms in der On-Phase. Bei der Sehnervgruppe ergab sich ein Wert von $56,53 \pm 0,76$ ms. Ein Mittelwert von $56,91 \pm 0,76$ ms wurde bei der MBP- und von $56,12 \pm 0,46$ ms bei der GFAP-Gruppe berechnet. Der Standardfehler lag bei diesen Werten im Bereich zwischen 0,46 und 0,76.

Bis zum negativen Ausschlag der On-Phase ergab sich für die Kontrollgruppe im Mittel eine Latenzzeit von $90,22 \pm 1,35$ ms. Die Werte für die Sehnerv-Gruppe beliefen sich im Mittel auf $95,35 \pm 2,22$ ms. Bei der MBP-Gruppe zeigten sich Werte von $94,83 \pm 1,48$ ms und bei der GFAP-Gruppe von $94,36 \pm 2,22$ ms. Der Standardfehler lag hier im Bereich zwischen 1,35 und 2,22 (Tabelle 3).

	Kontrolle	Sehnerv	MBP	GFAP
Latenz On Positiv				
Mittelwert (in ms)	55,76	56,53	56,91	56,12
Standardfehler	0,73	0,76	0,76	0,46
Latenz On Negativ				
Mittelwert (in ms)	90,22	95,35	94,83	94,36
Standardfehler	1,35	2,22	1,48	2,10

Tabelle 3: Es werden die Mittelwerte und die Standardfehler für die Latenzzeiten bis zum ersten positiven Ausschlag und bis zum ersten negativen Ausschlag der On-Phase für alle Gruppen (Kontroll-, Sehnerv-, MBP- und GFAP-Gruppe) wiedergegeben.

Absolut gesehen, wie in Abbildung 16 dargestellt, hatte die Kontrollgruppe in der On-Phase, sowohl bis zum positiven, als auch bis zum negativen Ausschlag die kürzeste Latenzzeit. Die Latenzzeiten der anderen Gruppen waren in beiden Fällen etwas länger. Bei der Latenzzeit bis zum positiven Ausschlag hatte die MBP-Gruppe die längste Zeit, bei der Latenzzeit bis zum negativen Ausschlag hatte die Sehnerv-Gruppe die längste Zeit.

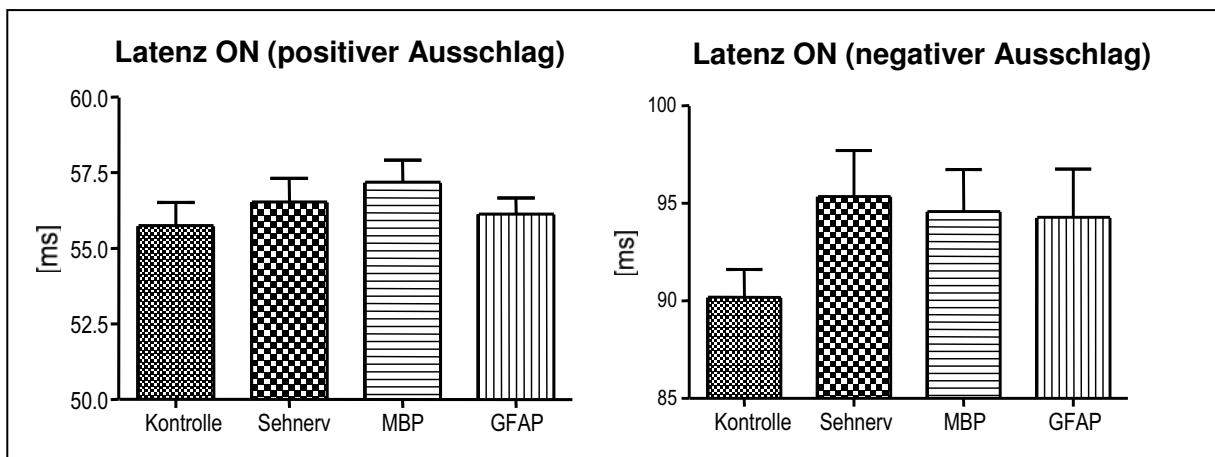


Abbildung 16: Die Abbildung zeigt zwei Säulendiagramme zur Latenzzeit der On-Phase. Das linke gibt die Latenzzeit in ms bis zum positiven Ausschlag, das rechte gibt die Latenzzeit in ms bis zum negativen Ausschlag für die einzelnen Gruppen (Kontrollgruppe, Sehnervgruppe, MBP- und GFAP-Gruppe) wieder. Der Fehlerindikator steht für den jeweiligen Standardfehler.

Die Werte erzielten keine Signifikanz, da insgesamt gesehen die Unterschiede zwischen den Gruppen für die Latenzzeiten der On-Phase sehr gering, teilweise geringer als eine Millisekunde, sind und die Schwankungsbreite der Werte dafür sehr groß war. Die p-Werte waren stets größer als 0,05.

5.4.2.2 Latenzzeiten in der Off-Phase

Für die Tiere der Kontrollgruppe lag die mittlere Latenz der Off-Phase bis zum ersten positiven Ausschlag bei $577,05 \pm 0,65$ ms. Bei der Sehnerv-Gruppe erfolgte der Ausschlag nach $578 \pm 1,10$ ms. Der positive Ausschlag wurde bei der MBP-Gruppe nach $582,34 \pm 4,57$ ms und bei der GFAP-Gruppe nach $582,10 \pm 2,28$ ms gemessen. Der Standardfehler lag für diese Werte zwischen 0,65 und 4,57.

Der negative Ausschlag der Off-Phase erfolgte bei der Kontrollgruppe im Mittel nach $625,45 \pm 2,04$ ms und bei der Sehnerv-Gruppe nach $619,39 \pm 2,61$ ms. Für die MBP-Gruppe ergab sich ein Mittelwert von $622,94 \pm 5,98$ ms und für die GFAP-Gruppe von $625,05 \pm 3,74$ ms für den ersten negativen Ausschlag. Der Standardfehler belief sich auf Werte zwischen 2,04 und 5,98 (Tabelle 4).

	Kontrolle	Sehnerv	MBP	GFAP
Latenz Off Positiv				
Mittelwert (in ms)	577,05	578,00	582,34	582,10
Standardfehler	0,65	1,10	4,57	2,28
Latenz Off Negativ				
Mittelwert (in ms)	625,45	619,39	622,94	625,05
Standardfehler	2,04	2,61	5,98	3,74

Tabelle 4: Es werden die Mittelwerte in ms und die Standardfehler für die Latenzzeiten bis zum ersten positiven Ausschlag und bis zum ersten negativen Ausschlag der Off-Phase für alle Gruppen (Kontroll-, Sehnerv-, MBP- und GFAP-Gruppe) berechnet.

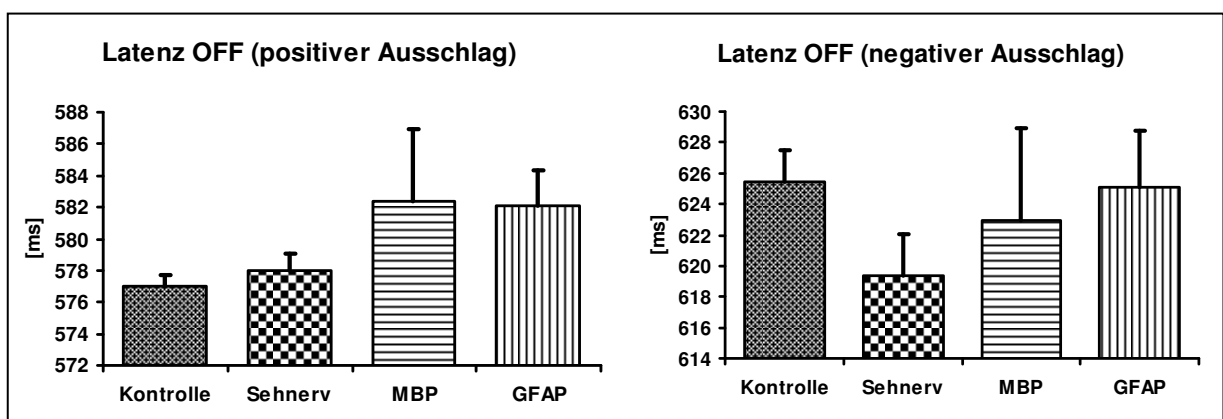


Abbildung 17: Die Latenzzeit der Off-Phase mit dazugehörigem Standardfehler ist hier mittels Säulendiagramm dargestellt. Das linke gibt die Latenzzeit bis zum positiven Ausschlag in ms, das rechte gibt die Latenzzeit bis zum negativen Ausschlag in ms für die einzelnen Gruppen (Kontroll-, Sehnerv-, MBP- und GFAP-Gruppe) wieder.

Absolut gesehen, siehe auch Abbildung 17, hatte die Kontrollgruppe die kürzeste Latenzzeit bis zum positiven Ausschlag der Off-Phase und die MBP-Gruppe hatte die längste Latenzzeit. Bis zum negativen Ausschlag der Off-Phase hatte die Sehnerv-

Gruppe die kürzeste, die Kontrollgruppe und die GFAP-Gruppe dagegen hatten die längste Latenzzeit.

Die Mittelwerte lagen wie bei den Latenzzeiten der On-Phase sehr dicht zusammen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt. Die p-Werte waren größer als 0,05.

5.4.2.3 Amplituden in On- und Off-Phase

Im Mittel ergab sich für die Kontrolltiere eine Amplitudenhöhe von $33,68 \pm 4,04 \mu\text{V}$ in der On-Phase. Die Sehnerv-Gruppe hatte in dieser Phase eine Amplitude von $47,53 \pm 4,07 \mu\text{V}$. Bei der MBP-Gruppe belief sich die Amplitudenhöhe auf $51,26 \pm 5,24$ und bei der GFAP-Gruppe auf $45,39 \pm 5,46 \mu\text{V}$. Der Standardfehler ergab Werte zwischen 4,04 und 5,46.

In der Off-Phase lag die mittlere Amplitudenhöhe für die Kontrolltiere bei $15,06 \pm 1,55 \mu\text{V}$ und für die Sehnerv-Gruppe bei $20 \pm 1,24 \mu\text{V}$. Die MBP-Gruppe erzielte in der Off-Phase eine Amplitudenhöhe von $20,12 \pm 1,82 \mu\text{V}$, während die GFAP-Tiere eine Amplitudenhöhe von $18,44 \pm 2,10 \mu\text{V}$ erreichten. Der Standardfehler lag zwischen 1,24 und 2,10 (Tabelle 5).

	Kontrolle	Sehnerv	MBP	GFAP
On Amplitude				
Mittelwert (in μV)	33,68	47,53	51,26	45,39
Standardfehler	4,04	4,07	5,24	5,46
Off Amplitude				
Mittelwert (in μV)	15,06	20,00	20,12	18,44
Standardfehler	1,55	1,24	1,81	2,10

Tabelle 5: Es werden die Mittelwerte in μV und die Standardfehler für die Amplitudenhöhen der On- und der Off-Phase für alle Gruppen (Kontroll-, Sehnerv-, MBP- und GFAP-Gruppe) wiedergegeben.

In den absoluten Werten zeigte sich, dass die Kontrolltiere in beiden Phasen die geringste Amplitudenhöhe erreichten, während die immunisierten Tiere höhere Werte erzielten (Abbildung 18).

Die erzielten Amplitudenhöhen lagen, wie die bereits vorher besprochenen Latenzzeiten, sehr eng beieinander. Die p-Werte waren größer als 0,05 und erbrachten so keine signifikanten Unterschiede.

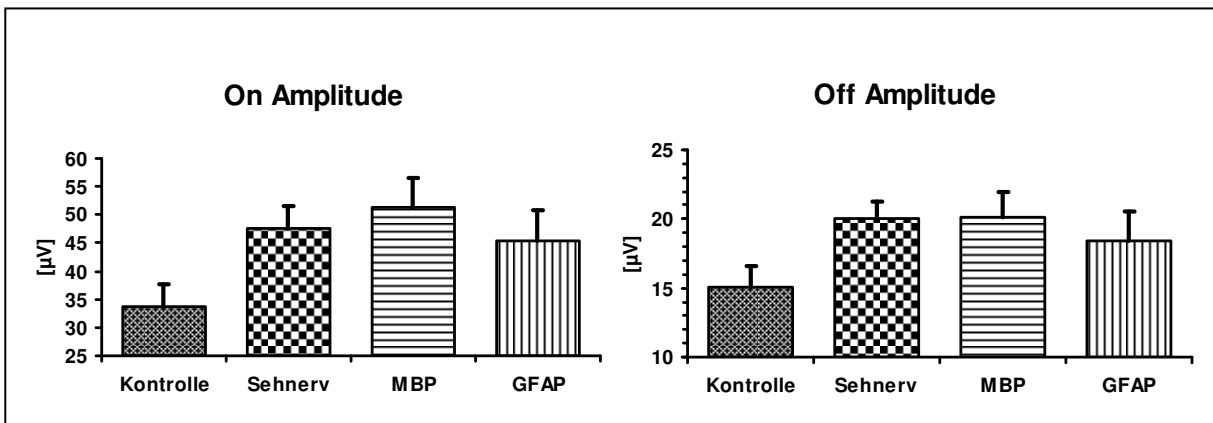


Abbildung 18: Die Abbildung zeigt zwei Säulendiagramme zur Amplitudenhöhe mit dazugehörigem Standardfehler. Das linke gibt die Amplitudenhöhe in der On-, das rechte gibt die Amplitudenhöhe in der Off-Phase in μV für die einzelnen Gruppen (Kontroll-, Sehnerv-, MBP- und GFAP-Gruppe) wieder.

5.4.3 Stationäre visuell evozierte Potentiale

Drei der vier durchgeführten VEP-Messungen waren stationäre visuell evozierte Potentiale. Zum einen das Kontrastmodulationsprogramm, das einmal mit einer Frequenz von 7,5 Hz und einmal mit einer Frequenz von 18 Hz durchgeführt wurde. Zum anderen eine Messung mit Blitzen unterschiedlicher Frequenz. Für diese beiden Programme wurde aus den absoluten Werten für die Amplitudenhöhe jeweils ein surrogater Marker berechnet. Für das Kontrastmodulationsprogramm war das der Wert S, mit dem hellkeitsmoduliertes Kontrastsehen quantifiziert werden kann. Beim Programm mit Blitzen unterschiedlicher Frequenz wurde der Wert TR berechnet, mit dem frequenzmoduliertes Kontrastsehen quantifiziert wird.

5.4.3.1 Wert S (Steigung)

Um die Stimulation mit unterschiedlichen Modulationstiefen in einem Parameter auszudrücken, wurde der Wert S (Steigung) berechnet. S ist eine Funktion der gemessenen Amplituden, die gegen den Logarithmus des dargebotenen Helligkeitsunterschieds aufgetragen werden. Dieser Wert hat somit den Vorteil von der absoluten Amplitude unabhängig zu sein. S repräsentiert hier also die Möglichkeit des visuellen Systems der Ratte durch die Höhe des Helligkeitsunterschieds eines Flickerstimulus moduliert zu werden (Jehle et al., 2009).

Zu dieser Berechnung wurde die Auswertung der stationären Flicker-VEPs nach der Fourier Analyse verwendet. Diese Flicker-VEPs mit Helligkeitsunterschieden von 5

%, 10 %, 20 %, 40 % und 80 % wurden einmal mit einer Flickerfrequenz von 7,5 Hz und einmal mit einer Frequenz von 18 Hz durchgeführt. Beide Programme wurden getrennt von einander berechnet und ausgewertet.

Abbildung 19 verdeutlicht den Programmablauf, den Frequenzunterschied der beiden Programme und die daraus folgenden Potentialverläufe.

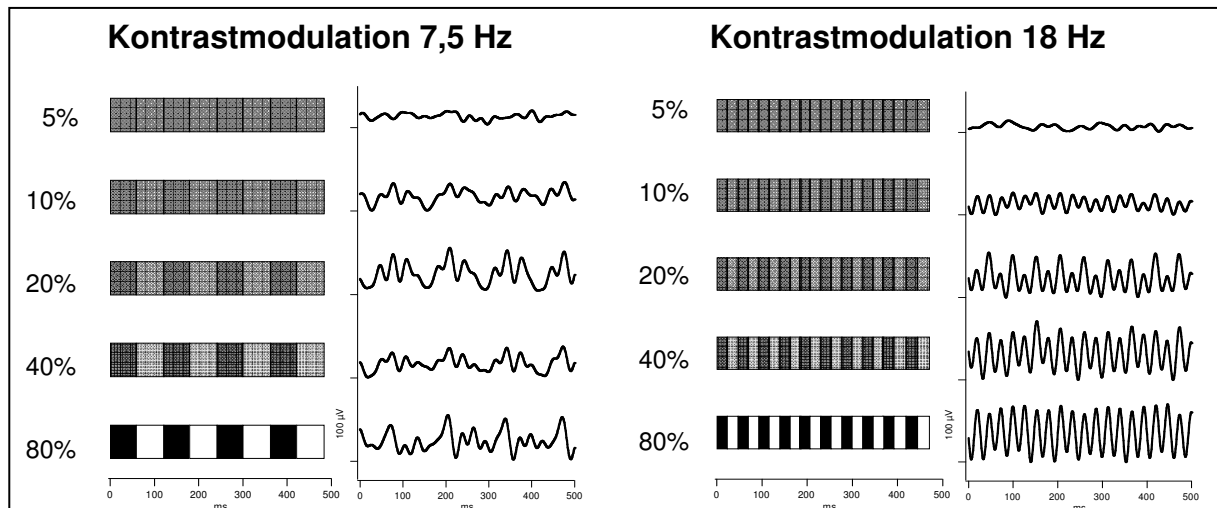


Abbildung 19: Die Abbildung zeigt den Programmablauf des stationären Flicker-VEPs und den dazugehörigen Potentialverlauf. Links ist dies für das Programm mit einer Frequenz von 7,5 Hz und rechts für das Programm mit einer Frequenz von 18 Hz dargestellt.

Bei einer Flickerfrequenz von 7,5 Hz sank die Amplitude der Reizantwort bei der Kontrollgruppe von 13,91 μV auf 1,04 μV bei einem von 80 % auf 5 % abnehmenden Helligkeitsunterschied. Bei der Sehnerv-Gruppe nahm die Amplitude von 14,33 μV auf 0,5 μV ab. Von 25,17 μV auf 1,67 μV sank die Amplitude bei der MBP-Gruppe und von 19,72 μV auf 1,12 μV bei der GFAP-Gruppe. Insgesamt war auffällig, dass die Kontrollgruppe im Vergleich zu allen Prüfgruppen die niedrigsten absoluten Werte für die Amplituden hatte. Die MBP-Gruppe hatte die höchsten Amplituden. Der Unterschied zwischen Kontrollgruppe und MBP-Gruppe betrug bei der höchsten Amplitude, die bei einem Helligkeitsunterschied von 80 % gemessen wurde, circa 11 μV .

Die Tabellen 6 und 7 zeigen für beide durchgeführten Programme getrennt die Zahlenwerte für den Helligkeitsunterschied, den Logarithmus des Helligkeitsunterschieds, die dazugehörigen Amplituden, und den daraus berechneten Wert S für die einzelnen Gruppen mit dem dazugehörigen Standardfehler. Die maximale Durchschnittsamplitude wurde in beiden Programmen bei einer Modulationstiefe von 80 % erzielt.

	Helligkeit	log Helligkeit	Kontrolle	Sehnerv	MBP	GFAP
Flicker 7,5 Hz	0,80	-0,10	13,91	14,33	25,17	19,72
Flicker 7,5 Hz	0,40	-0,40	10,63	14,95	18,63	14,90
Flicker 7,5 Hz	0,20	-0,70	10,63	5,72	14,77	14,47
Flicker 7,5 Hz	0,10	-1,00	7,39	1,09	10,68	8,55
Flicker 7,5 Hz	0,05	-1,30	1,04	0,5	1,67	1,12
Steigung S			9,63	13,75	18,25	14,47
Standardfehler			1,11	1,12	1,66	2,04

Tabelle 6: Aus der Tabelle sind die gemittelten Antwortamplituden der verschiedenen Gruppen in μV bei den dargebotenen Helligkeitsunterschieden von 80 %, 40 %, 20 %, 10 % und 5 % im Flickerprogramm mit einer Reizfrequenz von 7,5 Hz sowie der daraus berechnete Wert S und der Standardfehler abzulesen. Zum besseren Verständnis der Berechnung von S ist der Logarithmus des Helligkeitsunterschiedes mit aufgeführt.

Aus den in der Tabelle 6 aufgeführten Werten ergab sich für die Kontrollgruppe für S ein Mittelwert von $9,63 \pm 1,11$, für die Sehnerv-Gruppe von $13,75 \pm 1,12$, für die MBP-Gruppe von $18,25 \pm 1,66$ und für die GFAP-Gruppe von $14,47 \pm 2,04$. Der Standardfehler lag für diese Werte zwischen 1,11 und 2,04.

	Helligkeit	log Helligkeit	Kontrolle	Sehnerv	MBP	GFAP
Flicker 18 Hz	0,80	-0,10	13,03	19,91	23,79	17,37
Flicker 18 Hz	0,40	-0,40	11,03	17,41	20,45	15,46
Flicker 18 Hz	0,20	-0,70	9,93	16,33	19,32	14,06
Flicker 18 Hz	0,10	-1,00	8,87	13,31	14,52	12,52
Flicker 18 Hz	0,05	-1,30	0,54	1,12	0,89	0,76
Steigung S			9,02	13,84	17,19	12,01
Standardfehler			1,58	1,04	2,26	1,68

Tabelle 7: Aus der Tabelle sind die gemittelten Antwortamplituden der verschiedenen Gruppen (Kontroll-, Sehnerv-, MBP- und GFAP-Gruppe) in μV bei den dargebotenen Helligkeitsunterschieden von 80 %, 40 %, 20 %, 10 % und 5 % im Flickerprogramm mit einer Reizfrequenz von 18 Hz sowie der daraus berechnete Wert S und der Standardfehler abzulesen. Zum besseren Verständnis der Berechnung von S ist der Logarithmus des Helligkeitsunterschiedes mit aufgeführt.

Im zweiten Programm, das mit einer Flickerfrequenz von 18 Hz durchgeführt wurde, sank die Amplitude der Reizantwort für die Kontrollgruppe von $13,03 \mu\text{V}$ auf $0,54 \mu\text{V}$. Von $19,91 \mu\text{V}$ auf $1,12 \mu\text{V}$ sank die Amplitude der Sehnerv-Gruppe. Bei den MBP-Tieren nahm die Amplitude von $23,79 \mu\text{V}$ auf $0,89 \mu\text{V}$ ab und bei den GFAP-Tieren von $17,37 \mu\text{V}$ auf $0,76 \mu\text{V}$. Wie im oben beschriebenen Programm hatte die Sehnerv-Gruppe die niedrigsten Amplitudenwerte und die MBP-Gruppe die höchsten Werte. Der Unterschied zwischen Kontrollgruppe und MBP-Gruppe betrug bei der höchsten Amplitude, die bei einem Helligkeitsunterschied von 80 % gemessen wurde, ca. $10 \mu\text{V}$.

Wie aus der Tabelle 7 zu entnehmen, betrug S für die Kontrollgruppe im Mittel $9,02 \pm 1,58$ und für die Sehnervgruppe $13,84 \pm 1,04$. Bei der MBP-Gruppe belief sich der Mittelwert für S auf $17,19 \pm 2,26$ und bei der GFAP-Gruppe auf $12,01 \pm 1,68$. Der Standardfehler lag im Bereich zwischen 1,04 und 2,26.

In der Abbildung 20 werden die Funktionen S der unterschiedlichen Gruppen für beide Programme dargestellt. Es zeigte sich ein monotoner Anstieg der Amplituden bei Erhöhung des Helligkeitsunterschieds von 5 % auf 80 %, der linear verläuft, wenn er gegen den Logarithmus des Kontrasts aufgetragen wurde.

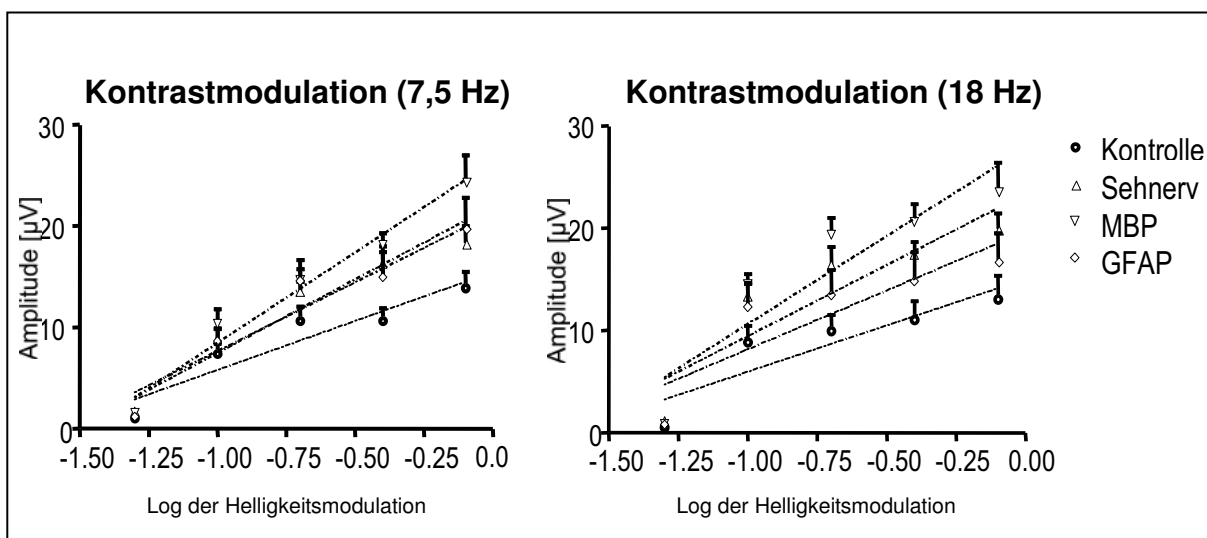


Abbildung 20: Es sind die Funktionen S der vier Gruppen (Kontroll-, Sehnerv-, MBP- und GFAP-Gruppe) mit dazugehörigem Standardfehler dargestellt: links für eine Stimulationsfrequenz von 7,5 Hz und rechts für eine Stimulationsfrequenz von 18 Hz. Dabei sind die gemessenen Amplituden in μV aufgetragen gegen den Logarithmus der Helligkeitsmodulation.

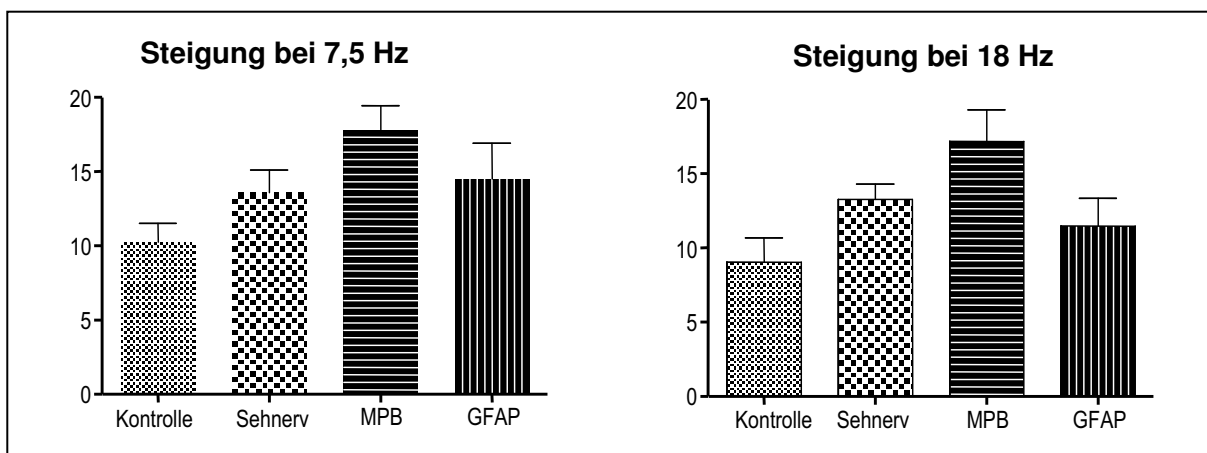


Abbildung 21: Der S-Wert ist mit dem dazugehörigen Standardfehler für die jeweilige Gruppe in einem Säulendiagramm veranschaulicht. Links werden die Werte für das Programm mit einer Frequenz von 7,5 Hz und rechts für das Programm mit einer Frequenz von 18 Hz dargestellt.

Wie in Abbildung 21 zu sehen, ergab S in beiden Programmen für die Tiere einer Gruppe in etwa gleiche Werte. Die Kontrollgruppe hatte absolut gesehen in beiden Programmen den niedrigsten S-Wert und die MBP-Gruppe hatte ebenfalls in beiden Programmen den höchsten S-Wert. Für die Sehnerv- und die GFAP-Gruppe ergaben sich in etwa gleiche S-Werte.

Es zeigten sich für die S-Werte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen und zwischen den beiden Programmen. Die p-Werte waren stets größer als 0,05.

5.4.3.2 Wert TR (Temporale Antworten)

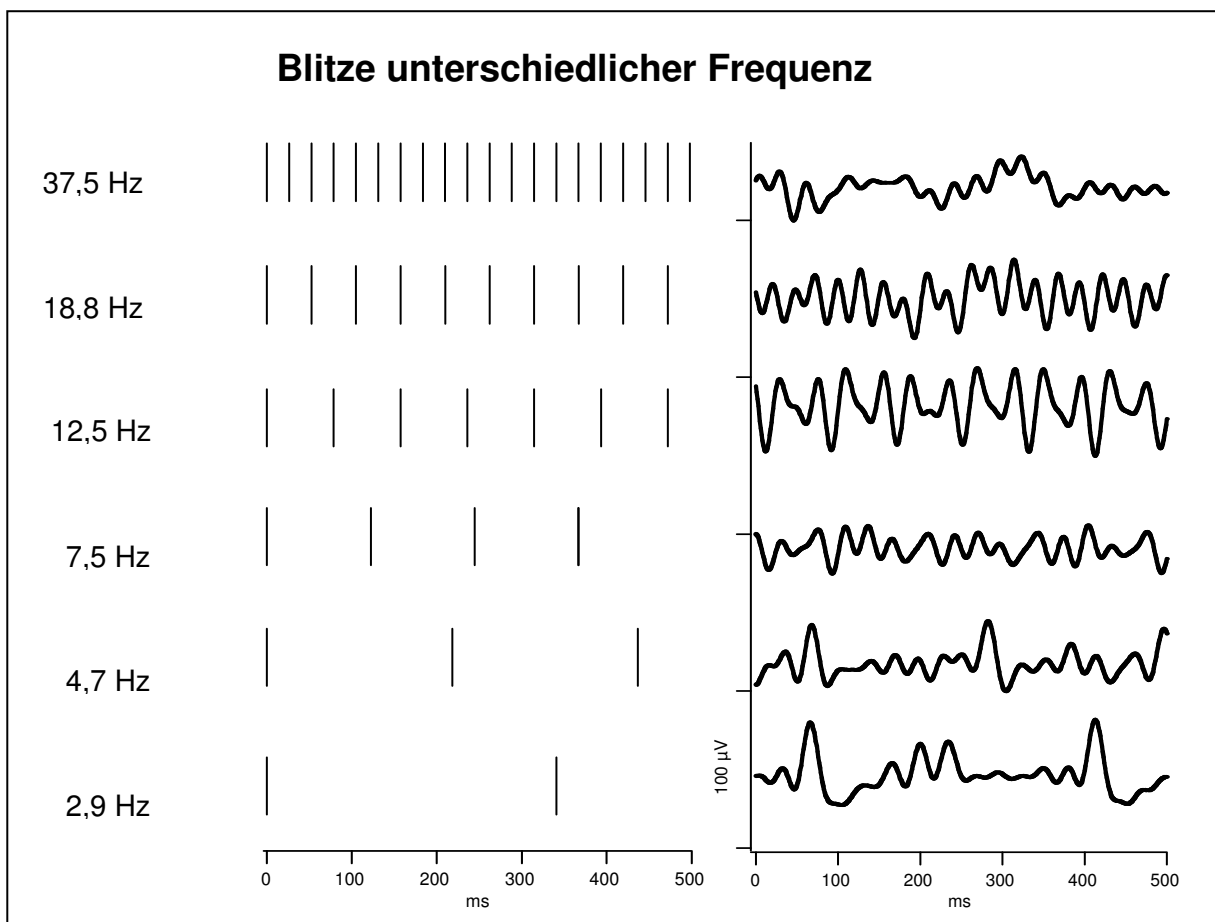


Abbildung 22: Die Abbildung zeigt den Ablauf der Reizserien mit Blitzen unterschiedlicher Frequenz. Ganz links wird die Frequenz der Lichtblitz in Hz angegeben. In mittleren Teil ist dies schematisch verdeutlicht. Rechts werden die bei der Messung möglichen Potentialverläufe dargestellt.

Um die Modulation von Blitzfrequenzen in einem Parameter auszudrücken, wurde der Wert TR (Temporale Antworten) berechnet. TR ist das Summenprodukt der gemessenen Amplituden der Reizantwort und der Stimulationsfrequenzen der dargebotenen Blitze. Zur Berechnung wurden alle Amplituden mit der dazugehörigen

Stimulationsfrequenz multipliziert und dann alle Werte addiert. So wurde berücksichtigt, dass bei hohen Frequenzen die Antworten durch Manipulation stärker beeinflusst werden (Jehle et al., 2009).

Für diese Berechnung wurden stationäre visuell evozierte Potentiale verwendet. Dazu diente ein Programm, bei dem Lichtblitze in verschiedenen Frequenzen gezeigt wurden. Der Programmablauf und die dadurch messbaren evozierten Potentialverläufe sind beispielhaft in Abbildung 22 zu sehen.

Die Höhe der Amplituden bei den 6 unterschiedlichen Reizfrequenzen zwischen 37,5 Hz und 2,88 Hz, sowie die sich dabei ergebenden Zahlenwerte für TR und der Standardfehler, sind für die verschiedenen Gruppen in Tabelle 8 aufgetragen.

	Kontrolle	Sehnerv	MBP	GFAP
Blitz (6x) 37,5 Hz	11,18	16,80	16,60	13,98
Blitz (6x) 18,75 Hz	20,67	29,70	31,74	26,65
Blitz (6x) 12,5 Hz	23,97	32,41	36,43	31,98
Blitz (6x) 7,5 Hz	20,79	23,73	25,71	23,86
Blitz (6x) 4,69 Hz	14,75	22,45	19,35	19,65
Blitz (6x) 2,88 Hz	10,27	16,06	14,10	12,80
Temporale Antworten (TR)	1361	1921	1997	1731
Standardfehler	197	140	145	210

Tabelle 8: In der Tabelle sind die Antwortamplituden der vier Gruppen in μV bei den verschiedenen Blitzfrequenzen (von 37,5 Hz bis 2,88 Hz) und der daraus berechnete Wert TR und der Standardfehler abzulesen.

Für die Tiere der Kontrollgruppe lagen die Amplituden für die Frequenzen von 2,88 bis 37,5 Hz zwischen 10,27 und 23,97 μV , für die Sehnerv-Gruppe zwischen 16,06 und 32,41 μV . Bei der MBP-Gruppe ergaben sich Amplitudenwerte von 14,10 bis 36,43 μV und für die GFAP-Tiere von 12,80 bis 31,98 μV .

Auch in diesem Programm lagen die absoluten Werte der gemessenen Amplituden für die Kontrolltiere am niedrigsten. Alle immunisierten Gruppen zeigten höhere Werte, wobei die MBP-Gruppe wieder die höchsten Amplituden aufwies. Der absolute Unterschied zwischen Kontroll- und MBP-Gruppe lag bei der höchsten gemessenen Amplitude bei 12,5 Hz bei 12 μV .

Für die Kontrollgruppe ergab sich ein Mittelwert von 1361 ± 197 für TR und für die Sehnerv-Gruppe von 1731 ± 210 . Bei der MBP-Gruppe wurde für TR ein Mittelwert von 1997 ± 145 und bei der GFAP-Gruppe von 1731 ± 210 berechnet.

In der Abbildung 23 sind zum einen die Antwortamplituden der einzelnen Gruppen zu den jeweiligen Reizfrequenzen aufgetragen (links). So wird die Frequenzmodulation

in einer Frequenztuningkurve verdeutlicht. Diese Kurve zeigt eine maximale Amplitude bei circa 15 Hz. Zum anderen werden die TR-Werte der vier Gruppen mit Standardfehler in einem Säulendiagramm abgebildet (rechts). TR hatte für die Kontrollgruppe den niedrigsten Wert, während die TR-Werte der immunisierten Gruppen etwas höher und in etwa gleich auf lagen. Es ergaben sich für die TR-Werte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die p-Werte waren stets größer als 0,05.

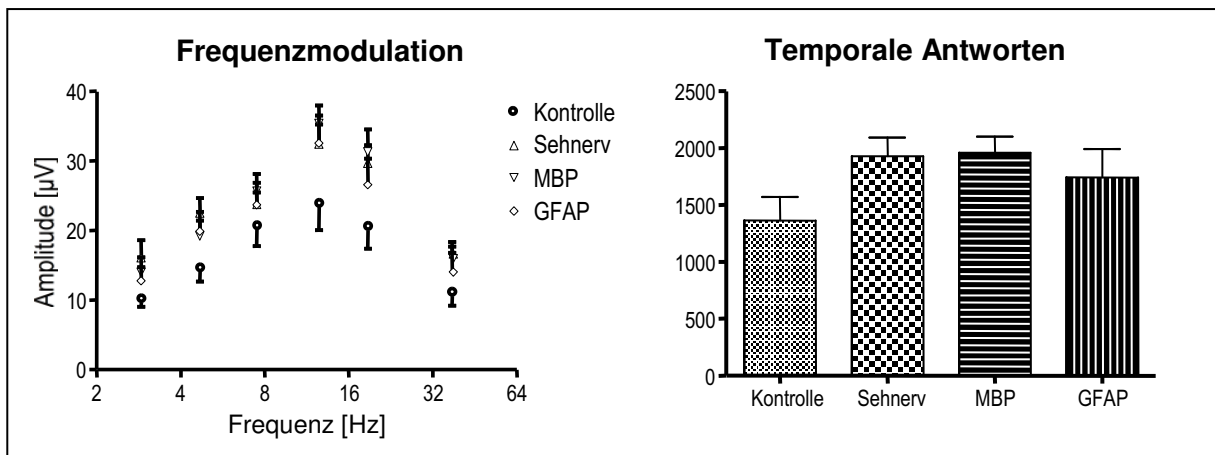


Abbildung 23: Die linke Abbildung verdeutlicht die Frequenzmodulation der einzelnen Gruppen, in dem die Antwortamplituden mit dem dazugehörigen Standardfehler bei den verschiedenen Blitzfrequenzen dargestellt werden. Das rechte Säulendiagramm zeigt die TR-Werte der einzelnen Gruppen mit dem Standardfehler.

5.4.4 Zusammenfassung zu den visuell evozierten Potentiale

Insgesamt waren die evozierten Potentiale bei allen Tieren ohne Probleme zu erheben und auswertbar.

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen hinsichtlich der Latenzen, der Amplitudenhöhen und der Werte für S und TR. Die p-Werte waren immer größer als 0,05.

In den absoluten Werten erscheint es lediglich auffällig, dass alle immunisierten Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe leicht verzögerte Latenzen und höhere Amplituden aufwiesen. Bei den Werten für S und TR hatten die Kontrolltiere niedrigere Werte als alle immunisierten Gruppen.

5.5 Blutentnahmen und Kammerwasserentnahme

Die Blutentnahmen aus den Schwanzvenen konnten bei allen Tieren zu den gewünschten Untersuchungszeitpunkten, eine Woche vor, sowie zwei und vier Wochen nach Immunisierung, durchgeführt werden. Es konnte stets 1 ml Blut abgenommen werden. Daraus ließ sich dann nach Zentrifugieren circa 0,5 ml Serum gewinnen.

Bei der Herzpunktion fünf Wochen nach Immunisierung konnte bei allen Tieren eine Blutmenge von 8 bis 10 ml, entsprechend circa 3 bis 5 ml Serum, gewonnen werden. Die Serumproben wurden bei -80 °C eingelagert.

Nach ihrem Tod konnte bei allen Tieren aus beiden Augen 10 µl Kammerwasser gewonnen und bei -80 °C eingefroren werden. Nur bei der Entnahme an einem Auge eines Tieres trat eine leichte blutige Verschmutzung auf. Alle anderen Proben waren klar.

Die Serum- und Kammerwasserproben wurden für andere Projekte verwendet.

5.6 Augen- und Sehnerventnahme

Nach der Kammerwasserentnahme wurden allen Tieren die Augen entnommen und der daran anschließende Sehnerv in einer Länge von circa 3 mm erhalten. Die Augen und Sehnerven wurden getrennt fixiert und aufbewahrt. Abbildung 25 zeigt das präparierte Auge unter dem Mikroskop vor und nach der Abtrennung des Sehnervs.

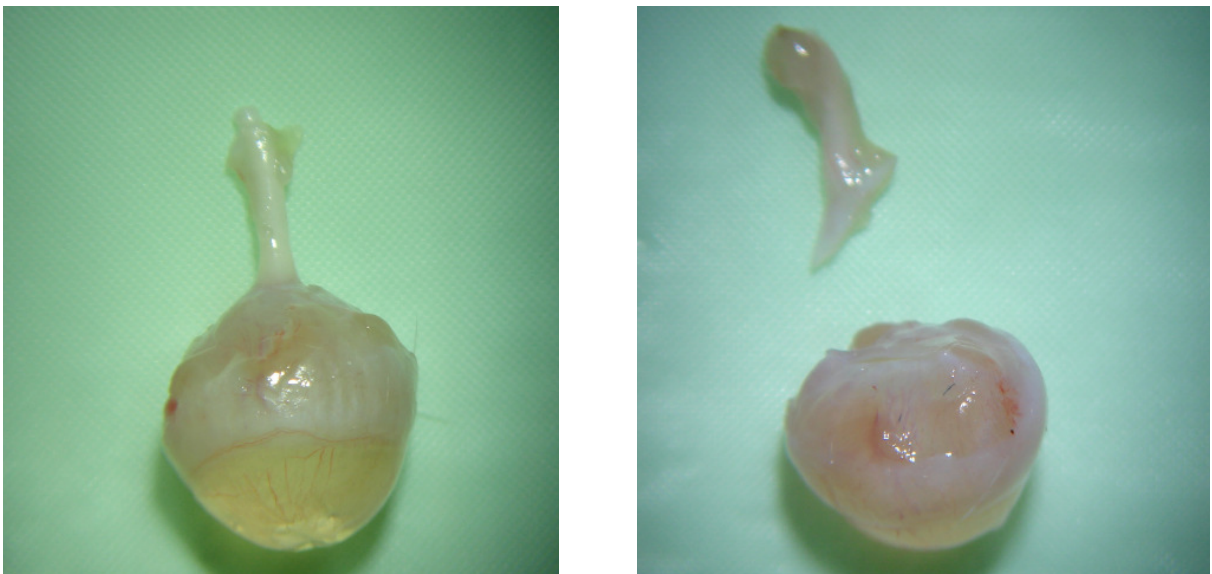


Abbildung 25: Die Abbildung zeigt links ein präpariertes Auge und den daran anschließenden Sehnerven. Rechts ist die Trennung von Sehnerv und Auge zu sehen.

Aus den fixierten Augen wurden Flachpräparate der Retinae mit Brn-3a-Antikörpern gefärbt, um die retinalen Ganglienzellen in verschiedenen Gesichtsfeldern unter dem Mikroskop auszuzählen. Allerdings haben die Brn-3a-Antikörper nicht gebunden, wodurch die Färbung gescheitert war. Die geplante Auszählung war somit nicht möglich. Aus nachfolgenden Studien der Arbeitsgruppe ist aber bekannt, dass die Immunisierung mit GFAP, MBP und Sehnerv-Homogenat zu einem Verlust von retinalen Ganglienzellen führt (Reichmann et al., 2008).

5.7 Gehirnentnahme und Histologische Untersuchung

Es wurden allen Ratten die Gehirne entnommen und fixiert. Sie wurden geschnitten und mit der Luxol Fast Blue- und Kresylviolett-Färbung gefärbt.

In der Abbildung 26 sieht man in zwei verschiedenen Vergrößerungen einen angefärbten Frontalschnitt durch das Hirn eines Tieres.

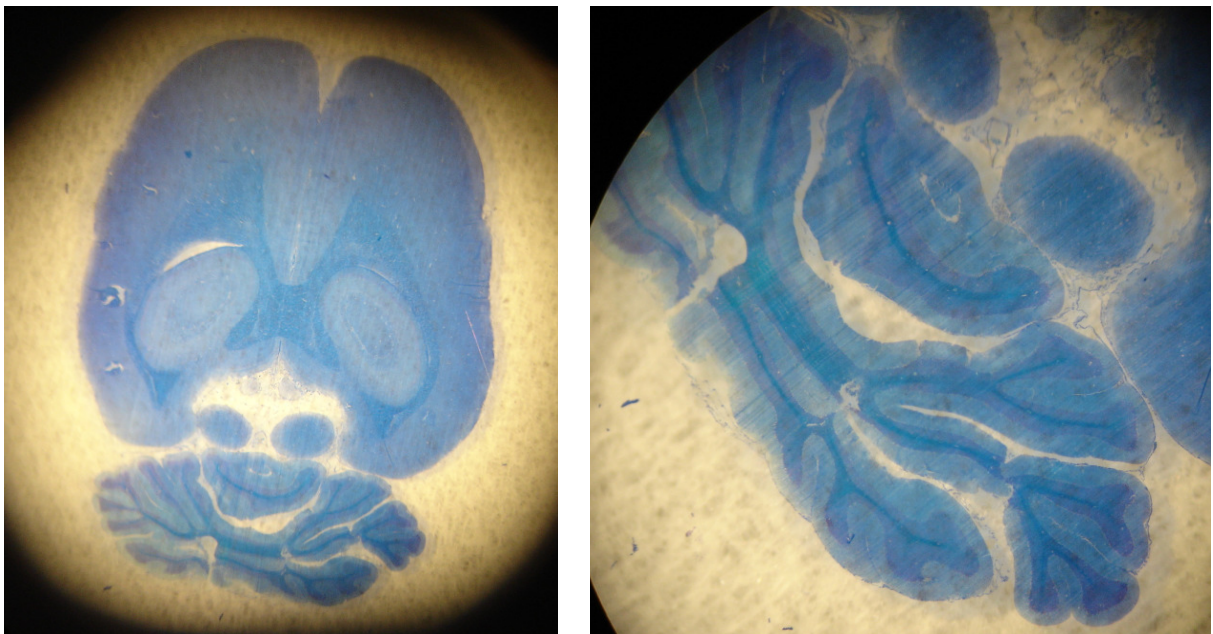


Abbildung 26: Links wird eine Übersichtsdarstellung eines mit Luxol Fast Blue und Kresylviolett gefärbten Gehirnschnittes eines Tieres der MBP-Gruppe gezeigt. Rechts ist eine vergrößerte Darstellung dieses Schnittes im Bereich des Kleinhirns abgebildet.
Quelle: Corinna Mühleib

Als Prädilektionsstellen für die Lokalisation von Plaques gelten bei der Multiplen Sklerose: Sehnerven, Balken, Hirnstamm, insbesondere Brücke mit Augenmuskelkernen, Kleinhirn, Kleinhirnstiele, die Pyramidenbahn auf jedem Niveau, der Boden des IV. Ventrikels, Hinterstränge des Rückenmarks und insgesamt die weiße Substanz des Zentralnervensystems. Seltener sind Hirnrinde,

Basalganglien und Rückenmarksgrau betroffen (Poeck und Hacke, 2001). Bei der Experimentellen Autoimmun Enzephalitis finden sich im Prinzip dieselben Prädilektionsstellen, allerdings ist das Rückenmark meist früher und stärker betroffen als das Hirn. In den Läsionen finden sich als Zeichen der inflammatorischen Demyelinisierung perivaskuläre Infiltrate von T-Zellen und Makrophagen.

Die Abbildung 27 zeigt in drei verschiedenen Vergrößerungen einen Ausschnitt der grauen und weißen Substanz.

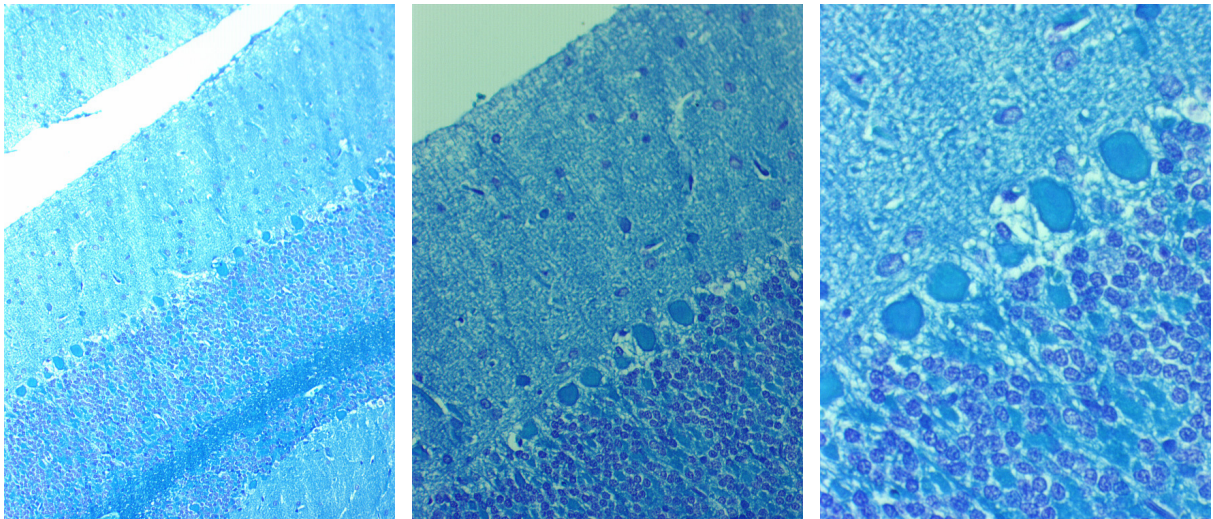


Abbildung 27: Es werden drei Bilder des bereits in Abbildung 26 gezeigten Gehirnschnittes eines Tieres der MBP-Gruppe im Bereich des Kleinhirns gezeigt von links nach rechts in zehnfacher, zwanzigfacher und vierzigfacher Vergrößerung.

Quelle: Corinna Mühleib

In der vorliegenden Studie wurden nur die Gehirne der Tiere untersucht und nicht das Rückenmark. An den genannten Prädilektionsstellen in Hirn wurden bei keinem der MBP-Tiere Entmarkungsherde oder andere Auffälligkeiten, wie Ansammlungen von Entzündungszellen, gefunden. Auch bei den Tieren der anderen Gruppen wurden bei der Untersuchung der gefärbten Hirnschnitte keine Auffälligkeiten beobachtet.

6. Diskussion

6.1 Das Experimentelle Autoimmun Glaukom Modell im Vergleich mit dem Glaukom

Während die Pathogenese des Glaukoms einen sehr langen und schleichenden Verlauf hat, bei dem der Schaden der retinalen Ganglienzellen sehr langsam voranschreitet, war der Zeitraum dieser Studie zum Experimentellen Autoimmun Glaukom mit insgesamt fünf Wochen sehr kurz.

In der Studie wird die Immunreaktion durch eine Immunisierung künstlich hervorgerufen. Durch den Zusatz von Freund-Adjuvant wird diese Immunreaktion verstärkt. Der Einsatz von Pertussistoxin soll die physiologischen Barrieren der Blut-Hirn- und Blut-Retina-Schranke angreifen. Dem gegenüber steht der Krankheitsverlauf des Glaukoms. Diese Erkrankung verläuft langsam und scheint sich durch immer wiederkehrende Ischämien, oxidative Stressoren nach Reperfusionen und das gehäufte Auftreten von lokalen Entzündungen selbst zu verstärken (Gugleta, 2009). Die Autoantikörper hätten somit lange Zeit, um sich zu entwickeln, zu vermehren und an den Zielorten anzugreifen.

Trotz dieser Unterschiede scheint das Modell des Experimentellen Autoimmun Glaukoms geeignet, um die Schlüsselrolle des Immunsystems bei Zellregulationen, wie dem Fortbestehen und Tod der retinalen Ganglienzellen als Reaktionen auf zellulären Stress, ähnlich den Vorgängen beim Glaukom, zu beleuchten. Dabei können die Mechanismen untersucht werden, ob und wie bestimmte Auto-Antikörper gegen spezifische Antigene zu einem Verlust von retinalen Ganglienzellen führen.

6.2 Augeninnendruck

Die Augeninnendruckmessungen wurden durchgeführt, da bei Patienten der erhöhte Augeninnendruck immer noch einer der wichtigsten klinischen Parameter zur Diagnostik und Therapiekontrolle des Glaukoms ist (Pfeiffer, 2001).

Die Messungen dieser Arbeit ergaben sowohl zwischen den Gruppen, als auch zwischen den verschiedenen Zeitpunkten der Studie, keinen signifikanten Unterschied und bewegten sich für alle Tiere stets im physiologischen Bereich.

Die hier erzielten Ergebnisse stimmen mit denen anderer Immunisierungsstudien überein. So wurden bei mit Hitzeschockprotein 27 immunisierten Tieren ebenfalls

keine signifikanten Augeninnendruck-Unterschiede zwischen den Gruppen oder den verschiedenen Zeiträumen festgestellt und auch in dieser Studie bewegten sich die Werte im Normalbereich, wobei ein signifikanter Verlust von retinalen Ganglienzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisbar war (Joachim et al., 2009).

Der durch Immunisierung verursachte Verlust retinaler Ganglienzellen findet in diesem Tiermodell demnach ohne eine Augeninnendruckerhöhung statt.

Die Augeninnendruckmessungen sollten in weiteren Versuchsreihen weiterhin durchgeführt werden, um die Ergebnisse zu verfestigen. Außerdem könnte es möglich sein, dass durch die erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn- und der Blut-Retina-Schranke, die durch den Einsatz von Pertussistoxin erzeugt wird, ein Einstrom von Substanzen aus der Blutbahn ins Kammerwasser entsteht (Brückener et al., 2003). Sollte dieser so stark werden, dass der Abfluss des Kammerwassers ihn nicht kompensieren kann, wäre eventuell auch ein Anstieg des Augeninnendrucks möglich. Dieser wäre dann aber von der Immunisierung unabhängig und nur durch den Versuchsaufbau bedingt. Um in einem solchen Fall keine falschen Schlüsse zu ziehen, muss diese Möglichkeit in Betracht gezogen werden.

Es gibt verschiedene Theorien zur Rolle des Augeninnendrucks und einer autoimmunen Komponente bei der Glaukomerkrankung. Die Arbeitsgruppe um Wax vermutet, dass autoimmune Prozesse bei Normaldruckglaukom-Patienten mehr im Vordergrund stehen könnten, als bei Patienten mit erhöhtem Augeninnendruck (Wax et al., 2008). Komplexe Autoantikörperprofile mit signifikantem Unterschied zum Gesunden und auch untereinander wurden sowohl bei Normaldruckglaukom- als auch bei Offenwinkelglaukom-Patienten nachgewiesen (Reichelt et al., 2008).

Außerdem gibt es die Theorie, dass die immunologische Situation eines Individuums oder Tieres es zu einer bestimmten Reaktion auf eine Augeninnendruckerhöhung prädisponiert. Bis heute ist es unklar, warum Patienten mit okulärer Hypertension keine retinalen Ganglienzellverluste haben, während Patienten mit Normaldruckglaukom solche bereits bei physiologischen Augeninnendruckwerten verzeichnen oder auch warum einige Patienten sehr gut auf eine medikamentöse Augeninnendrucksenkung reagieren und andere bei gleicher Senkung weiterhin progrediente Ganglienzellverluste einbüßen (Musch et al., 2009). Bei verschiedenen Rattenstämmen wurde eine Augeninnendruckerhöhung durchgeführt. Dabei kam es in den unterschiedlichen Stämmen trotz beinahe identisch erhöhtem Augeninnendruck zu signifikant unterschiedlichen Verlusten von retinalen

Ganglienzellen. Dieser Unterschied korrelierte nach Meinung der Autoren mit der Immunsystem-Aktivität der Stämme (Bakalash et al., 2002). In anderen Studien an Tiermodellen, zeigte sich ein Zusammenhang zwischen den retinalen Ganglienzellverlusten und der Funktion T-Zell-vermittelter protektiver Immunität. Bei Abwesenheit reifer T-Zellen war der Verlust retinaler Ganglienzellen größer (Kipnis et al., 2001; Schori et al., 2001; Schwartz und Kipnis, 2001). Des Weiteren korreliert der verstärkte Verlust retinaler Ganglienzellen mit der Möglichkeit der Induktion einer Experimentellen Autoimmun Enzephalitis (Kipnis et al., 2001) und einer Immundefizienz (Bakalash et al., 2002).

All diese Studienergebnisse zusammengenommen legen nahe, dass eine autoimmune Komponente, unabhängig vom erhöhten Augeninnendruck, einen retinalen Ganglienzellverlust verursachen kann bzw. fehlende Reparaturmechanismen den Schaden bedingen, während eine Erhöhung des Augeninnendrucks nur bei einer bestimmten immunologischen Verfassung des Individuums zu solchen Verlusten führt.

6.3 Fundusuntersuchung

Augenhintergrundspiegelung und Fundusbeurteilung sind in der Augenheilkunde, nicht nur beim Glaukom, sondern bei einer ganzen Reihe von weiteren Erkrankungen, einer der wichtigsten Befunde zur Diagnostik und Verlaufsbeobachtung (Grehn, 2007a). Die bildliche Dokumentation lässt direkte Vergleiche zwischen Voraufnahmen und dem aktuellen Status zu. Der glaukomatöse Schaden ist insbesondere durch eine Exkavation der Papille gekennzeichnet.

Bei keinem der Tiere ergab sich zu einem Zeitpunkt der Studie ein auffälliger Befund der Papille oder der Gefäße des Augenhintergrundes. Auch beim Vergleich der Bilder eines Tieres zu den verschiedenen Zeitpunkten ließen sich keine Unterschiede feststellen.

In einer anderen Studie wurden am Experimentellen Autoimmun Glaukom ebenfalls Fundusaufnahmen angefertigt, in denen auch keine pathologischen Veränderungen zu sehen waren (Joachim et al., 2009).

Da durch den Aufbau beider Studien nur Frühschäden erzeugt werden, glaukomatöse Schäden auf Fundusbildern aber meist erst spät erkennbar werden (Grehn, 2007b), waren diese Ergebnisse weitestgehend zu erwarten.

Trotzdem ist es sinnvoll die Fundusaufnahmen in nachfolgenden Studien weiterzuführen, da es möglich sein könnte, entweder durch eine Erhöhung der Konzentration der Antigene und somit auch der Antikörper, oder durch Verlängerung der Studienzeit doch sichtbare Schäden am Fundus hervorzurufen. So sind z.B. parapapilläre Hämorrhagien ein Zeichen für lokalisierte Ganglienzellverluste (Jeoung et al., 2008) und könnten in nachfolgenden Studien eventuell auftreten.

Da bei den mit Hitzeschockprotein 27 immunisierten Tieren bereits retinale Ganglienzellverluste nachgewiesen wurden (Joachim et al., 2009), ist bewiesen, dass Veränderungen am Fundus vorliegen. Die Fundusspiegelung und Fotografie scheint nur nicht sensitiv genug zu sein, diese nachzuweisen. In Zukunft wäre es wünschenswert ein deutlich sensitiveres Verfahren anwenden zu können. Dafür würde sich zum Beispiel die okuläre Kohärenz Tomographie (OCT) anbieten. Dies ist ein modernes bildgebendes Untersuchungsverfahren, mit dem Schnittbilder des Augenhintergrundes in sehr hoher Auflösung gemacht werden können (Schuman et al., 1995). So kann bei Glaukompatienten bereits einige Jahre vor der Entstehung von Gesichtsfeldausfällen eine Verdünnung der Nervenfaserbündel am Sehnervenkopf nachgewiesen werden, die dem Untersucher bei der Funduskopie entgangen wäre (Chen und Lee, 2007). Außerdem kann das Verfahren sogar Informationen über den Blutfluss in retinalen Gefäßen und den Sauerstoffgehalt des retinalen Gewebes liefern (van Velthoven et al., 2007). Das Verfahren könnte geeignet sein, auch im EAG-Modell eine Abnahme der retinalen Schichten und einen Verlust von retinalen Ganglienzellen nachzuweisen, denn bei einem Tiermodell mit Ratten zu chirurgisch induzierter okulärer Hypertension hat es sich bereits zur Analyse der Strukturen von Sehnervenkopf und Retina bewährt (Guo et al., 2005).

6.4 Visuell evozierte Potentiale

Untersuchungen von Kontrast-, Bewegungs- und Flickerwahrnehmung eignen sich zur Frühdiagnose des Glaukoms, auch wenn diese Verfahren in der Klinik auf Grund ihres aufwendigen Versuchsaufbaus noch keine Routine geworden sind. Schon vor dem Auftreten typischer Gesichtsfeldausfälle sind Veränderungen von visuell evozierten Potentialen, wie z.B. Latenzverzögerungen, Amplitudenerniedrigungen und Formveränderungen, erfassbar (Grehn, 2007b). In einer Studie an 49 Patienten mit okulärer Hypertension zeigten 24 Patienten pathologische VEP-Befunde. Im Verlauf entwickelten genau diese Patienten glaukomatöse Gesichtsfelddefekte,

während die Patienten mit VEP-Normalbefund auch in den Nachkontrollen weiterhin keine Gesichtsfeldausfälle hatten (Bray et al., 1991). Den visuell evozierten Potentialen wird somit beim Glaukom prognostische Bedeutung nachgesagt, da der Nachweis von Schäden am vorderen optischen System vor Einsetzen von Gesichtsfelddefekten erbracht werden kann.

Es gibt bislang keine Immunisierungsstudien zum Glaukom, in denen auch visuell evozierte Potentiale durchgeführt wurden.

In verschiedenen Studien zur Experimentellen Autoimmun Enzephalitis, bei der auch des Öfteren eine Augenbeteiligung im Sinne einer Optikusneuritis zu verzeichnen ist, wurden bei der Durchführung von visuell evozierten Potentialen widersprüchliche Ergebnisse erzielt. So gibt es Studien, die eine Latenzverlängerung und Formveränderungen der Amplitude nach einem Zeitraum von fünf Wochen beschreiben (Diem et al., 2008). In einer anderen Studie waren die VEP-Veränderungen immer nur dann nachzuweisen, wenn auch klinisch auffällige neurologische Symptome vorlagen (Bilbool et al., 1983). In einer Studie an Lewis-Ratten mit akuter und chronischer EAE konnten keine VEP-Veränderungen beobachtet werden, obwohl in den somatosensiblen evozierten Potentialen pathologische Veränderungen nachweisbar waren (Deguchi et al., 1992).

6.4.1 Bewertung der Latenzzeiten

Die Latenzzeit gilt als Analogmaß für den Zeitbedarf der Sehbahn. Eine Latenzverlängerung deutet auf eine Leitungsverzögerung im Verlauf des Sehnervs hin, sie korreliert dabei mit dem Zustand der Markscheiden (Stöhr et al., 2005).

Zur Bestimmung der Latenzzeit wurden in dieser Arbeit die Ergebnisse eines transienten VEPs verwendet. In den vorliegenden Ergebnissen zeigten sich bei allen Prüftieren im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht verlängerte Latenzen, in der On-Phase bis zum positiven und zum negativen Ausschlag und in der Off-Phase bis zum positiven Ausschlag. Der Unterschied liegt im Millisekundenbereich und ist somit sehr gering und nicht signifikant.

In diesem Tiermodell geht der durch Immunisierung erzeugte retinale Ganglienzellverlust mit einer geringen Latenzverlängerung einher, die allerdings in diesem Versuchsaufbau keine statistische Relevanz erzielen kann.

Setzt man voraus, dass der retinale Ganglienzellverlust bei den immunisierten Tieren ähnliche Lokalisationen aufweist wie bei Glaukompatienten (Wax et al., 2008), sind die Ergebnisse folgendermaßen zu erklären: Bei Glaukompatienten kommt es zuerst

zu einem Ausfall der parafovealen Faseranteile (Qiugley, 1993; Araie, 1995). Die somit unbeeinträchtigten fovealen Faseranteile, die etwas langsamer leiten, tragen aber mehr zur Entstehung des Potentials bei, da sie in der Hirnrinde überproportional repräsentiert sind (Poeck und Hacke, 2001a). So kommt es bei dieser Konstellation zu einer milden Verzögerung der Gesamtlatenz, die als Pseudolatenzverzögerung bezeichnet wird (Maurer et al., 2005). Da bei den hier verwendeten blitzevozierten Potentialen die Standardabweichung der Latenzen circa dreimal so hoch ist, wie bei musterevozierten Potentialen (Halliday, 1976), kann dieser eventuell nur sehr feine Unterschied zwischen den Tieren keine statistische Relevanz erreichen. Der Versuchsaufbau lässt aber nur blitzevozierte Potentiale zu, weil bei musterevozierten Potentialen eine Blickfixierung notwendig ist, die bei den wachen und freibeweglichen Ratten nicht möglich ist.

Neben Studien, die visuell evozierten Potentialen bei der Früherkennung des Glaukoms eine Sensitivität und Spezifität von beinahe 100 % zuschreiben und von einer mittleren Latenzverzögerung bei Glaukompatienten von 25 ms berichten (Klistoner et al., 2007), gibt es ebenso Studien, die die Aussagekraft der visuell evozierten Potentiale eher als gering einschätzen. So waren bei Glaukompatienten die VEP-Latenzen nur um circa 1 bis 3 ms verlängert (Rodarte et al., 2006). Ein solcher Unterschied ist auf Grund der hohen interindividuellen Varianz nur in Studien mit sehr hoher Probandenzahl bestimmbar. Demzufolge wäre die Bestimmung der Latenzzeit zur frühen Glaukomdiagnostik bei Tierversuchen eher weniger geeignet.

6.4.2 Beurteilung der Amplitudenhöhe

Die Bewertung von Amplituden und Formunterschieden ist nicht einfach, da es eine große interindividuelle Variationsbreite gibt (Vogel, 2006). Die Höhe der Amplitude korreliert mit der Anzahl der leitenden Fasern (Stöhr et al., 2005) und eine Amplitudendepression mit der Abnahme der Sehfunktion (Maurer et al., 2005).

Als typischer VEP-Befund bei Patienten mit Glaukom oder Optikusneuritis finden sich eine Amplitudenerniedrigung und eine Formveränderung im Sinne einer Verbreiterung der Amplitude (Grehn, 2007b).

Keiner dieser Befunde war bei den Tieren dieser Arbeit nachweisbar. Im Gegensatz zu den erwarteten Ergebnissen sind die Amplituden aller immunisierten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Auch wenn dabei keine statistische Relevanz erzielt wurde, so bestätigen sich diese Ergebnisse sowohl in den transienten als auch in den stationären Potentialen. Dabei ist die Amplitude der MBP-Gruppe in den

stationären Flicker-VEPs bei 7,5 Hz sogar bald doppelt so hoch wie die Amplitude der Kontrollgruppe. Eine Erhöhung der Amplitude ist bisher in der Literatur nicht beschrieben und mögliche Erklärungsmodelle deshalb schwer zu finden.

Der erste Gedanke, dass die Ergebnisse durch einen Messfehler zustande kommen, ist durch den Versuchsaufbau und die Messreihenfolge der Tiere eigentlich ausgeschlossen. In der hier vorliegenden Arbeit könnte sich die Amplitudenerhöhung der drei immunisierten Gruppen im Gegensatz zur Kontrollgruppe eventuell durch den Einsatz von Pertussistoxin und Freund's Adjuvant erklären. Die Kontrollgruppe erhielt diese beiden Substanzen gar nicht. In nachfolgenden Studien könnte diese Theorie durch eine zusätzliche Gruppe, die nur mit diesen beiden Substanzen immunisiert wird, verifiziert werden.

Wenn man davon ausgehen will, dass die Amplitudenerhöhung sich durch die gebildeten Autoantikörper bedingt ist, wäre es eine Theorie, dass in der Kontrollgruppe ein Verlust der Sehfunktion oder in den immunisierten Gruppen eine „Verbesserung der Sehfunktion“ statt gefunden hat. Für beide Möglichkeiten gibt es aber keine plausible Erklärung. Von einigen Arbeitsgruppen wurden für Auto-Antikörper neben destruktiven Effekten auch regulatorische Funktionen, wie z.B. die Modulation der Aktivität und Funktion bestimmter Zielmoleküle, beschrieben (Erlanger, 1989; Kulberg, 1999). So könnten einige Auto-Antikörper protektive Effekte haben und der Verlust dieser Antikörper zur Entwicklung eines Glaukoms bzw. zu einem höheren Risiko an einer Glaukomerkrankung führen. In den Serum- und Kammerwasseranalysen der Arbeitsgruppe um Grus und Joachim sind neben erhöhten Auto-Antikörper bei Offenwinkelglaukom- und Normaldruckglaukom-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe auch Erniedrigungen einiger Antikörper zu finden (Joachim et al., 2005). Es könnte durchaus möglich sein, dass eben diese erniedrigten Antikörper wichtige Funktionen innehaben. Eine künstliche Erhöhung dieser Antikörper könnte neuroprotektive Effekte auslösen. GFAP gehört zu diesen bei Offenwinkelglaukom- und Normaldruckglaukom-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigten Antikörpern (Reichelt et al., 2008). Diese Hypothese wird auch von der Arbeitsgruppe um Schwartz unterstützt, die daran arbeitet Glaukompatienten eventuell mit einer Stärkung dieser protektiven natürlichen Autoimmunität, im Sinne einer Impfung, behandeln zu können (Fisher et al., 2001; Schwartz, 2004 und 2007). So gehen im Hinblick auf das Glaukom einige Arbeitsgruppen davon aus, dass wohl eher eine Immunmodulation als eine Immunsuppression, wie bei anderen Erkrankungen als Therapie angewandt,

neuroprotektive Wirkung erzielen könnte (Schwartz, 2003; Bakalash et al., 2003). Ob es auch möglich sein könnte, durch Immunisierung positive Mechanismen auszulösen und so sogar die Sehfunktion zu verbessern, ist äußerst fraglich und zum jetzigen Zeitpunkt nur Spekulation. Zur genaueren Klärung müssen weitere Studien beitragen.

6.4.3 Bewertung des Kontrastsehens

Ein wichtiger Parameter zur Bewertung der Sehfunktion ist das Kontrastsehen. Glaukoma-Patienten (Schmeisser und Smith, 1989; Breton et al., 1991; Tyler, 1981) und Patienten mit Optikusneuritis (Nakayama et al., 1993) haben eine verminderte zeitliche Kontrastsensitivität. Das bedeutet, dass das Kontrastsehen früh und intensiv verändert ist. Bei Sehnervenerkrankungen allgemein gilt, dass das räumliche (Antal et al., 2001; Bodis-Wollner et al., 1979) und zeitliche (Martus et al., 2000) Kontrastsehen früher und stärker verändert sind als andere funktionelle Parameter, wie zum Beispiel die Sehschärfe (Spekreijse und Apkarian, 1986; Vedula et al., 2007). Zur Überprüfung des räumlichen und zeitlichen Kontrastsehens ist die VEP-Ganzfeldstimulation besonders geeignet.

S (Steigung) repräsentiert die Möglichkeit des visuellen Systems der Ratte durch den Helligkeitsanstieg eines Flickerstimulus moduliert zu werden und ist dabei unabhängig von der absoluten Amplitude. Der Wert S hat sich in Studien von Jehle bereits als Parameter bewährt, der in Tiermodellen differenziert auf äußere Einflüsse, wie Narkosemittelgabe, Ischämie der Retina und Sehnervenkompression reagiert. Er dient somit zur Quantifizierung der residualen visuellen Funktion von Ratten. In Studien von Doktor Jehle zeigte sich, dass sich die Berechnung des Markers S bei Flicker-Frequenzen von 19 Hz besonders für geringere Schäden eignet, während die Berechnung bei Frequenzen von 7,5 Hz besonders für stärkere Schäden geeignet ist (Jehle et al., 2009).

Durch TR (Temporale Antworten), die temporale Kontrast Funktion, wird die Abhängigkeit der VEP-Amplitudenhöhe von verschiedenen Blitzfrequenzen verdeutlicht. In seinen Studien bewies Jehle bereits, dass die Höhe der Antwortamplitude in Ratten abhängig von der Frequenz ist (Jehle et al., 2009). Die in dieser Studie erzielten Amplituden sind am höchsten bei Frequenzen um circa 17 Hz. Dies entspricht den Werten, die Jehle bei den von ihm untersuchten Brown Norway Ratten erzielte (Jehle et al., 2009). Durch die Berechnung von TR wird berücksichtigt, dass Antworten bei höheren Reizfrequenzen vulnerabler für äußere

Manipulation sind. Bei einem Fröhschaden des Sehnervs bei Glaukumpatienten sind pathologische Veränderungen beispielsweise deutlicher in Antworten auf einen höherfrequenten Flicker-Stimulus (Holopigian et al., 1990). TR reagiert immer relativ stark und kann zwischen den verschiedenen Ausmaßen eines Schadens schlechter differenzieren. Der Marker hat eine große Sensibilität bei kleiner Variationsbreite. Er kann funktionelle Defizite des visuellen Systems aufdecken, dabei das Ausmaß des Schadens aber nicht quantifizieren.

In den Ergebnissen der visuell evozierten Potentiale dieser Studie zeigen alle immunisierten Tiere sowohl für S als auch für TR höhere Werte als die Kontrolltiere, jedoch ohne statistisch relevant zu werden. Wie schon bei der Beurteilung der Amplitudenhöhe diskutiert, kommen als mögliche Theorie positive Effekte durch die Immunisierung in Frage. Wahrscheinlicher scheinen aber Auswirkungen der Substanzen Pertussistoxin und Freund's Adjuvant. Ein Messfehler ist eigentlich ausgeschlossen.

In nachfolgenden Studien sollten weiterhin beide Marker bestimmt werden, denn das Ausmaß einer Behandlung oder einer Manipulation lässt sich insbesondere bei neuen Forschungstheorien, wie in dieser Arbeit, schwer vorhersagen. Nur durch die Kombination beider Werte kann sowohl ein kleiner als auch ein größerer Schaden entdeckt werden. Sollten die zukünftigen Studien über einen längeren Zeitraum und eventuell mit Antikörpern in höherer Dosierung arbeiten, sind Ergebnisse wie in dieser Studie eher nicht mehr zu erwarten, denn es ist von einem Verlust von retinalen Ganglienzellen auszugehen, wie bei den mit Hitzeschockprotein 27, MBP, GFAP, Vimentin und Sehnerv-Homogenat immunisierten Ratten durch histologische Auszählung der retinalen Ganglienzellen bewiesen (Reichmann et al., 2008; Joachim et al., 2009).

6.4.4 Vorschläge zur Erweiterung der Methode

Durch die bisher erzielten Ergebnisse der visuell evozierten Potentiale lassen sich keine eindeutigen Schlüsse ziehen. Es waren Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen nachweisbar, jedoch erzielten diese Unterschiede keine statistische Signifikanz. Eine leichte Latenzverminderung, eine Amplitudenerhöhung und eine „Verbesserung“ des Kontrastsehens bei den immunisierten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe sind eine Konstellation, die so noch nicht in der Literatur beschrieben wurde. In weiteren Studien bleibt es zu klären, ob sich die Ergebnisse bestätigen lassen. Eventuell könnten eine größere Gruppenstärke und mehr als zwei

Ableitungen der visuell evozierten Potentiale dazu beitragen, dass statistische Relevanz erzielt wird.

Da es bezüglich der Amplitude der visuell evozierten Potentiale große interindividuelle, aber geringere intraindividuelle Unterschiede gibt (Maurer et al., 1988), könnte es zur besseren Interpretation der Werte beitragen, die Potentiale nicht nur einmal am Ende der Studie abzuleiten, sondern zu mehreren Zeitpunkten im Studienverlauf. Eine Messung vor Immunisierung und spätere Messungen könnten für jedes Tier einzeln miteinander verglichen und so Unterschiede der Gruppen verstärkt hervorgehoben werden. Das hier angewandte Modell ist ein chronisches Implantatmodell und somit sind Messungen zu mehreren Zeitpunkten möglich. Von mehreren Arbeitsgruppen wurde bereits berichtet, dass die durch chronische Implantatmodelle erzielten Ergebnisse über eine gewisse Zeit stabil sind (Brankack und Klingberg, 1990; Bringmann und Klingberg, 1995; Guarino et al., 2004; Jehle et al., 2008, 2009).

Die Verluste der retinalen Ganglienzellen sind bei Glaukumpatienten nicht immer an beiden Augen gleich stark ausgeprägt. Da für das in dieser Arbeit etablierte Tiermodell noch keine großen Erfahrungswerte vorliegen, könnte es auch interessant sein, die Augen der Tiere getrennt zu untersuchen. Der Versuchsaufbau ermöglicht dies in zweierlei Hinsicht. Zum einen hat die Arbeitsgruppe um Jehle bereits damit Erfahrung gemacht, den Tieren ein Auge mit einer Klappe zu verblinden, was die Tiere nach kurzer Eingewöhnungszeit durchaus gut tolerieren (Jehle et al., 2008). Zum anderen könnten die zwei gemessenen Kanäle über den beiden Hirnhemisphären getrennt voneinander ausgewertet werden, da bei den Ratten mehr als 90 % der retinalen Axone nicht im Chiasma opticum kreuzen (Schober, 1975), sondern nur eine kleine Subpopulation (Wizenmann et al., 1993). So entspricht zum Beispiel dem rechten Auge der kontralateral über der linken Hemisphäre abgeleitete Kanal.

Eventuell sind zum Nachweis von retinalen Ganglienzell-Verlusten beim Experimentellen Autoimmun Glaukom-Modell visuell evozierte Potentiale an wachen Ratten aber auch nicht ideal um Fröhschäden zu entdecken, da die Potentiale bei der Ganzfeldreizung erst pathologisch sind, wenn insgesamt bereits größere Gesichtsfelddefekte vorliegen (Maurer et al., 1988).

6.4.5 Elektoretinogramme als alternatives elektrophysiologisches Verfahren

Visuell evozierte Potentiale prüfen die komplette Reizweiterleitung vom Rezeptor über die intraretinale Verarbeitung, die gesamte Sehbahn bis hin zur kortikalen Verarbeitung. Insbesondere interessieren im Zusammenhang mit dieser Arbeit aber die retinalen Ganglienzellen. Deren Funktion kann zum Beispiel durch ein ergänzendes Muster-Elektoretinogramm isoliert bestimmt werden. Als sensitiver Test für die Funktion der retinalen Ganglienzellen hat sich diese Methode bewährt, denn Muster-Elektoretinogramme sind geeignet Störungen der elektrischen Antwort der retinalen Ganglienzellen bereits im Frühstadium aufzuzeigen (Pfeiffer et al., 1993). Das Elektoretinogramm ist schon von verschiedenen Arbeitsgruppen bei Tiermodellen, auch bei Ratten, eingesetzt worden (Ben-Shlomo und Orti, 2006; Danias et al., 2006; Jehle et al., 2008 und 2009). Nach Hinweisen aktueller Studien scheint eine Komponente des Elektoretinogramms ein sensitiver Indikator für glaukomatösen Schaden zu sein (Colotto et al., 2000; Viswanathan et al., 1999 und 2001). Während visuell evozierte Potentiale durch ihre große Variabilität nicht sehr sensitiv scheinen. Bei einer Studie an Affen, bei denen durch Laserkoagulation des Trabekelwerkes ein erhöhter Augeninnendruck provoziert wurde, zeigte sich eine direkte Korrelation zwischen den Elektoretinogrammen und den später histologisch nachgewiesenen Ganglienzellschäden. Die Affen dieser Studie wurden auch mit visuell evozierten Potentialen untersucht. Dabei zeigte sich, dass diese variabler waren und somit den Schaden nicht so gut nachweisen konnten wie die Elektoretinogramme (Johnson et al., 1989). Bei Patienten mit okulärer Hypertension konnte das Elektoretinogramm mit einer Sensitivität von 80 % und einer Spezifität von 71 % ein Jahr vor Konversion in ein manifestes Glaukom diese Progression bereits vorhersagen (Bach et al., 2006).

Auch beim Experimentellen Autoimmun Glaukom-Modell an Ratten könnte sich diese Methode also eignen Schäden im Sinne eines Untergangs der retinalen Ganglienzellen zu erkennen, noch bevor diese in der Fundusuntersuchung oder visuell evozierten Potentialen detektierbar sind. Die Mitarbeiter um Jehle haben diese Methode zur Früherkennung eines Schadens in einem Ratten-Modell zu okulärer Hypertension bereits mit Erfolg eingesetzt (Jehle et al., 2008). Die Kombination von Elektoretinogrammen mit visuell evozierten Potentialen erlaubt die Differenzierung zwischen Erkrankungen der Netzhaut und Erkrankungen der Sehbahn (Stöhr et al., 2005). Dies wäre auch für das Experimentelle Autoimmun Glaukom-Modell interessant, um die Lokalisation der Schädigung genau zu definieren.

6.5 Myelin basisches Protein-Gruppe

Die MBP-Gruppe soll in dieser Arbeit getrennt von den anderen beiden immunisierten Gruppen besprochen werden, da sich die Pathomechanismen vermutlich von einander unterscheiden.

6.5.1 Histologische Gehirnuntersuchung

Da Antikörper gegen MBP in der Forschung bereits dazu eingesetzt werden in Tieren eine Experimentelle Autoimmun Encephalomyelitis (EAE) zu erzeugen, wurden den Tieren die Gehirne entnommen und histologisch auf Entmarkungsherde untersucht. Die Experimentelle Autoimmun Enzephalitis ist ein Tiermodell, das einen möglichen Pathomechanismus der Multiplen Sklerose darstellen soll.

Typisch für die Multiple Sklerose und Experimentelle Autoimmun Enzephalitis sind entzündliche Entmarkungsherde in der weißen Substanz des gesamten Zentralnervensystems, die auch als Plaques bezeichnet werden. Bei der Multiplen Sklerose ist eine häufige Frühercheinung die Retrobulbärneuritis bzw. Optikusneuritis (Poeck und Hacke, 2001b). Eine ähnliche Erscheinung wird im Tiermodell beobachtet. Sie wird als Experimentelle Optikusneuritis (EON) bezeichnet und ist durch eine inflammatorische Demyelinisierung des Sehnervs, eine axonale Verletzung und Apoptose von retinalen Ganglienzellen gekennzeichnet (Shindler et al., 2008).

Es ist demnach von Interesse, ob bei den Tieren der MBP-Gruppe Entmarkungsherde im Gehirn vorliegen. Aber auch bei den anderen immunisierten Gruppen ist es sinnvoll, eine Untersuchung des Gehirns durchzuführen, um zu kontrollieren, ob auch die Immunisierung mit diesen Antigenen bei beschädigter Blut-Hirn-Schranke Schäden am Gehirn erzeugt. Im selbst hergestellten Sehnerv-Homogenat sind Proteine, wie zum Beispiel Myelin basisches Protein, Proteolipid Protein und Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein enthalten, die als Antigene im Modell der Experimentellen Autoimmun Enzephalitis eingesetzt werden (Mannie et al., 2009).

In der vorliegenden Studie wurden an den fixierten Gehirnen keine Entmarkungsherde oder andere auffälligen Pathologien gefunden, insbesondere nicht an den oben bereits erwähnten Prädilektionsstellen. Zwischen den verschiedenen Gruppen waren keine Unterschiede zu erkennen. Zu keinem Zeitpunkt der Studie gab es bei den Tieren neurologische klinische Auffälligkeiten.

Es ist bekannt, dass klinische und histologische Zeichen bei Lewis Ratten nur in einem bestimmten Zeitraum nachzuweisen sind (Beeton et al., 2007). In einer Immunisierungsstudie an Lewis-Ratten, bei der zum einen der Beobachtungszeitraum länger war und zum anderen eine Booster-Immunisierung durchgeführt wurde, wurden bei den Tieren der MBP-Gruppe Lähmungserscheinung auffällig und bewertet (Gramlich et al., 2008; Reichmann et al., 2008). Es ist bekannt, dass die Demyelinisierung von Strukturen im Hirn mit klinisch neurologischen Zeichen korreliert (Zargari et al., 2007). Dabei konnte sogar ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Entzündung und dem Axonschaden, sowie dem Grad der neurologischen Behinderung der Tiere beobachtet werden (Wujek et al., 2002).

Neben einer Gehirnuntersuchung am Ende der Studie, sollte bei klinischen Zeichen der Tiere, ein EAE-Score erhoben werden, bei dem die Beweglichkeit der Tiere bewertet wird. Aus den Studien zur Experimentellen Autoimmun Enzephalitis ist bekannt, dass die Tiere 7-12 Tage nach Immunisierung Lähmungserscheinungen des Schwanzes und der Extremitäten bis hin zur vollständigen Paralyse entwickeln können. Der Schweregrad der Lähmung ist abhängig von der Konzentration des verabreichten MBPs (Davis, 1999). Es ist bereits eine gängige Eingruppierung in Schweregrade für die Versuchstiere beschrieben und etabliert (Devaux, Enderlin et al., 1997). Die Werte der Untersuchung könnten zwischen den Gruppen und den verschiedenen Zeitpunkten verglichen werden.

Außerdem könnte zusätzlich zur histologischen Untersuchung des Gehirns auch eine histologische Untersuchung des Rückenmarks durchgeführt werden. Wie aus aktueller Literatur bekannt korreliert die Lokalisation der Läsionen mit den klinischen Zeichen (Wujek et al., 2002). Auf Grund der bisher beschriebenen Symptome bei Mäusen und Ratten sind die Läsionen wahrscheinlich vorwiegend im Rückenmark lokalisiert.

6.5.2 Hypothesen zum Pathomechanismus bei Immunisierung mit Myelin basischem Protein

Immunologische Vorgänge bei der Experimentellen Autoimmun Enzephalitis, welche Vorgänge bei der Multiplen Sklerose simuliert, sind bereits gut verstanden.

Durch Pertussistoxin werden die Blut-Hirn- und die Blut-Retina-Schranke geschwächt, denn in verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass eine Erhöhung der Antikörper gegen Myelin basisches Protein zwar zu einer Verstärkung der

Erkrankung führte (Guo et al., 2004), in gesunden Tieren alleine aber keine Erkrankung auslöste (Schluesener et al., 1987). Dies legt nahe, dass Antikörper gegen Myelin basisches Protein die intakte Blut-Hirnschranke nicht passieren und auch nicht schädigen können, bei Vorschäden aber dazu in der Lage sind diese zu verstärken. Im Modell der Experimentellen Autoimmun Enzephalitis findet nach der Immunisierung bei den Tieren eine T-Zell-bedingte Entzündungsreaktion statt. Dabei dringen MBP-spezifische CD-4-positive-T-Zellen mittels eines Homing-Prozesses durch die Blut-Hirn-Schranke in das Hirngewebe ein und bewegen sich frei im Parenchym (Odoardi et al., 2007). Die T-Zellen binden dann an MHC-II-Antigen repräsentierende Zellen, z.B. Endothelzellen, Mikroglia und Astrozyten. So kommt es zu einer Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle (Odoardi et al., 2007). Dabei kommt es auch zu prokoagulierender Aktivität und einem verstärkten Untergang der Blut-Hirn-Schranke (Tabira, 1989). Es folgt eine Antikörper-abhängige Demyelinisierung, denn Myelin basisches Protein, ein trans-Membran-Protein mit einem spezifischen Gewicht von 16 kDa, übernimmt eine wichtige Rolle bei der Myelinisierung, sowohl im peripheren, als auch im zentralen Nervensystem. Insgesamt scheinen die Antikörper gegen Myelin basisches Protein nicht alleine für die Immunreaktion verantwortlich zu sein, sondern es findet vermutlich ein verstärkender Prozess statt, bei dem Myelinproteine proteolytisch gespalten und von Mikroglia aufgenommen und präsentiert werden. Auf diese Weise werden noch zusätzliche Antikörper aktiviert. Insbesondere scheinen auch die myelinisierten Neurone des Sehnervs betroffen zu sein. Dabei kommt es neben einer Demyelinisierung auch zum Angriff und zur Zerstörung des Axons selbst. Liegt eine Verletzung des Axons vor, entsteht eine Störung des Transports von Neurotrophinen zu den retinalen Ganglienzellen. Dies wurde unter anderem durch das Nervkompressions-Modell und das Sehnerv-Ischämie-Modell belegt (Anderson und Hendrickson, 1974; Minckler et al., 1976; Quigley und Addicks 1980; Pease et al., 2000). Diese Vorgänge bedingen den Untergang der retinalen Ganglienzellen. Bei Patienten mit Multipler Sklerose wurde schon in verschiedenen Studien eine Erhöhung von Antikörper gegen Myelin basisches Protein im Serum (Paterson et al., 1981; Reindl et al., 1999; Schmidt et al., 2001; Chamczuk et al., 2002; Vojdani et al., 2003) und im Liquor (Warren und Catz, 1994; Reindl et al., 1999) festgestellt. Zurzeit wird untersucht, ob Myelin basisches Protein als Indikator für die Stärke bzw. Aktivität der Multiplen Sklerose dienen könnte (Berger et al., 2003; Tomassini et al., 2007). Für die Erstdiagnose einer Multiplen Sklerose scheint es nicht geeignet (Lim

et al., 2005). Die genaue Rolle von Auto-Antikörper gegen Myelin basisches Protein bleibt nach wie vor ungeklärt.

Da die Experimentelle Autoimmun Enzephalitis eine T-Zell vermittelte Autoimmunerkrankung ist, wird daran gearbeitet über eine Identifizierung des T-Zell-Rezeptors (TCR) und seine Blockade eine Immuntherapie zu entwickeln. Im Tierversuch konnten bereits erste Erfolge verzeichnet werden (Matsumoto, 2000).

6.6 Hypothesen zum Pathomechanismus bei Immunisierung mit Glia fibrillärem saurem Protein und Sehnerv-Homogenat

Bei den mit Glia fibrillärem saurem Protein und Sehnerv-Homogenat immunisierten Tieren vermuten wir einen etwas anderen Pathomechanismus. Bei diesem Pathomechanismus haben die Antikörper möglicherweise eine wichtigere Rolle als die zelluläre Komponente.

In ex vivo Versuchen wurden auf isolierte menschliche Retina Antikörper gegen Hitzeschockprotein 27 aufgetragen. Durch Endozytose wurden die Antikörper in die retinalen Gliazellen und die Neurone aufgenommen und konnten dann sowohl im Zytoplasma als auch in Kernstrukturen nachgewiesen werden. Es kam zu einem durch Apoptose ausgelösten Zelltod (Tezel et al., 2000). In der Arbeitsgruppe um Joachim wurden am Modell des Experimentellen Autoimmun Glaukoms Ablagerungen von autoretinalen Antikörpern in der Retina nachgewiesen, die mit dem Verlust von retinalen Ganglienzellen korrelierten (Gramlich et al., 2009). Bei der Untersuchung der Augen eines Patienten mit Normaldruckglaukom post mortem zeigten sich Ablagerungen von Immunglobulin G und Immunglobulin A in den retinalen Ganglienzellen der inneren und äußeren Retina. Um diese Ablagerungen zeigten sich Zeichen für Apoptose der retinalen Ganglienzellen (Wax et al., 1998b). Dies sind Hinweise für einen durch Auto-Antikörper vermittelten retinalen Schaden. Die Auto-Antikörper erreichen dabei ihre Zielzellen auch durch einen Schaden der Blut-Hirn-Schranke und der Blut-Retina-Schranke, der durch Pertussistoxin induziert wird. Einen solchen durch Auto-Antikörper verursachten Schaden gibt es auch bei der krebs-assoziierten Retinopathie, bei der heterogene kreuzreagierende Antikörper gegen retinale Antigene und ein durch diese Antikörper verursachter retinaler Schaden nachgewiesen werden können (Khan et al., 2006).

In der hier vorliegenden Studie wurden zur Immunisierung zum einen ein selbst hergestelltes Sehnerv-Homogenat verwendet. Dieses enthält ein Gemisch einer

ganzen Reihe von Antigenen, unter anderem Myelin basisches Protein, Proteolipid Protein und Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein, wie sie ebenfalls beim Modell der Experimentellen Autoimmun Enzephalitis eingesetzt werden. Die einzelnen Antigene sind bei einem Gesamtproteingehalt von 8 mg, der in dieser Arbeit verabreichten Lösung, im Vergleich zur MBP- und GFAP-Gruppe nicht sehr hoch dosiert. Die Angriffspunkte sind dadurch deutlich zahlreicher, aber die Reaktionen nicht so stark. Zum anderen wurde Gliafibrilläres saures Protein (GFAP) verwendet. Dieses ist ein intermediäres Filamentprotein mit einem spezifischen Gewicht von 32 kDA und kommt in Gliazellen, Astrozyten und in den Müller-Zellen der Retina vor. Es spielt bei verschiedenen zellulären Funktionsprozessen eine Rolle und ist auch an neurodegenerativen Prozessen beteiligt, zum Beispiel an der Ausbildung einer Gliaarbe. Bei Stress und Verletzungen ist es hochreguliert (Dibas et al., 2008). Erhöhte Werte dieser Auto-Antikörper waren auch im Serum von Patienten mit feuchter Makuladegeneration nachzuweisen (Joachim et al., 2007a). Es zeigten sich auch deutlich erhöhte Konzentrationen der Antikörper bei Sehnervkompression (Chen und Weber, 2002) und erhöhtem Augeninnendruck (Lam et al., 2003). Nach hydrostatischer Druckerhöhung ergaben sich erhöhte Antikörpertiter gegen GFAP in Astrozyten von menschlichen Sehnerven (Salvador-Silva et al., 2001). Astrozyten haben eine entscheidende Aufgabe bei der extrazellulären Milieukontrolle, so z.B. bei der Kontrolle der extrazellulären Kalium-Konzentration und beim Abtransport von Glutamat. Antikörper gegen Glia fibrilläres saures Protein könnten diesen Steuermechanismus der extrazellulären Milieukontrolle stören und so zur Akkumulation toxischer Stoffe und zum Untergang von retinalen Ganglienzellen führen.

Die Pathomechanismen des Experimentellen Autoimmun Glaukom-Modells müssen in zukünftigen Studien weiter erforscht werden. Dass eine zelluläre Komponente ebenfalls beteiligt ist, kann nicht ausgeschlossen werden. Außerdem ist von Interesse welche Antikörper über diesen Mechanismus zum Untergang von retinalen Ganglienzellen führen.

6.7 Ursprung der Antikörper

Der Ursprung eines Auto-Antikörpers oder einer autoreaktiven Zelle ist in keiner Autoimmunerkrankung einfach zu ermitteln und bei vielen Erkrankungen sind die Antikörper bekannt, ihr Ursprung aber bleibt ungeklärt, so zum Beispiel bei der

Multiplen Sklerose, Diabetes mellitus Typ I und Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises. Um Erkrankungen präventiv zu vermeiden, sollte es das Ziel sein, diese Ursprünge zu ergründen. Bisher gestaltet sich dies aber sehr komplex und es gibt bestenfalls Theorien.

Zum einen gibt es den Ansatz, dass die Auto-Antikörper schon seit der Embryonalentwicklung im Körper vorkommen und nur durch die bestehenden Schranken von der Zerstörung abgehalten werden. Kommt es nun zu Schäden an diesen Schranken, können die Antikörper ihre Antigene erreichen. Wie muss man sich das vorstellen? In der Embryonalentwicklung sterben retinale Ganglienzellen zusammen mit ihrem Stützgerüst den Gliazellen, wenn sie keine Konnektierung an neuronale Zentren erhalten (Vecino et al., 2004). Bei diesem Vorgang werden die apoptotischen Zellen durch das frühe Immunsystem entsorgt (Barron, 1995). Der Kontakt der Antikörper mit ihren Antigenen ist dadurch gewährleistet, dass die Zonulae occludentes der Blut-Hirn-Schranke und der Blut-Retina-Schranke zu dieser Zeit erst im Aufbau sind (Risau et al., 1998). Es sind also keine funktionell intakten Barrieren vorhanden. Die im Laufe der Entwicklung errichteten Barrieren werden beim Glaukompatienten möglicherweise durch Hypoxie, Ischämie und Reperfusionen belastet. Davon scheinen auch retinale Ganglienzellen, sowie die Gliazellen und das Epithelgewebe betroffen. Die Zonulae occludentes werden dabei anscheinend geschwächt oder sogar zerstört.

Zum anderen gibt es die Theorie des Molekularen Mimikry, bei der davon ausgegangen wird, dass durch molekulare Ähnlichkeit von bakteriellen oder viralen Strukturen, die im Rahmen einer Infektion im Körper auftauchen, zu körpereigenen Strukturen Autoantikörper entstehen und so Erkrankungen ausgelöst werden (Oldstone, 2005). Beispielsweise soll es durch eine Kreuzreaktion zwischen der klebsiellen-spezifischen Nitrogenase mit HLA B27 zur ankylosierenden Spondylitis kommen (Pichler et al., 1996). Auch Kreuzreaktionen von Chlamydien-Proteinen mit HLA B27 wurden beschrieben (Ramos et al., 2002). Diese Theorie gilt es aber noch zu bestätigen. Interessant ist aber in diesem Zusammenhang, dass bei Glaukompatienten erhöhte Helicobacter pylori Antikörper-Werte nachgewiesen wurden (Kontouras et al., 2001) und dass Epitope von Rhodopsin, gegen welches Antikörper bei Normaldruckglaukom-Patienten gefunden wurden, Ähnlichkeiten mit häufigen bakteriellen und viralen Pathogenen haben (Romano et al., 1999).

Da es durchaus sinnvolle Hinweise für beide Theorien gibt, ist es auch denkbar oder sogar wahrscheinlich, dass beide Wege nebeneinander existieren.

6.8 Ausblick

In nachfolgenden Arbeiten sollten andere Verfahren zum Nachweis der retinalen Ganglienzellverluste durchgeführt werden. Als weiteres elektrophysiologisches Verfahren sind Elektroretinogramme in Erwägung zu ziehen. Vor allem eine Kombination von visuell evozierten Potentialen und Elektroretinogrammen könnte viel versprechend sein. Neben Fundusuntersuchungen wäre auch eine okuläre Kohärenz Tomographie in Erwägung zu ziehen.

Zur Erforschung der genauen Vorgänge nach der Immunisierung bieten sich Serum- und Kammerwasser-Analysen an. Aus dem entnommenen Serum und Kammerwasser können Antikörperprofile mittels Western Blot und Microarray-Methoden erstellt werden. Da das Serum zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen wurde, kann ein zeitlicher Verlauf der immunologischen Antwort nachvollzogen werden. Das Kammerwasser wurde ganz am Ende der Studie entnommen und lässt damit nur eine Endpunktanalyse zwischen den verschiedenen Gruppen zu. Sie zeigt dafür aber an, ob sich die Immunantwort bis ins Auge fortgesetzt hat. Das Auge hat, wie in der Einleitung dargelegt, ein besonderes Immunprivileg. Ein Vergleich der Antikörper in Serum und Kammerwasser ist lohnenswert, um eventuell eine lokale Antikörper-Produktion am Auge selbst feststellen zu können. Bei Glaukompatienten wurde bereits gezeigt, dass die Antikörper-Profile im Kammerwasser und die Profile des Serums differieren (Joachim et al., 2007 b und c). Komplexe Protein-Profile im Kammerwasser sowie im Serum konnten am Experimentellen Autoimmun Glaukom-Modell bereits nachgewiesen werden (Gramlich et al., 2008; Joachim et al., 2009). In einem experimentellen Glaukom-Modell an Hunden hat sich kürzlich gezeigt, dass die Expression von retinalem Hitzeschockprotein 60 als Funktion der Chronizität der Erkrankung abnimmt (Savagian et al., 2008). Die Serum-Antikörper gegen Hitzeschockproteine variieren aber nicht in Abhängigkeit vom glaukomatösen Schaden (Wax et al., 2001).

Insbesondere immunhistologisch bieten sich einige Möglichkeiten, die Mechanismen der Pathogenese des Experimentellen Autoimmun Glaukom-Modells aufzuklären. So können die entnommenen Augen mit anhängendem Sehnerv untersucht werden. Mit spezifischen Färbungen für retinale Ganglienzellen können diese Zellen ausgezählt werden, um so einen Unterschied zwischen den Gruppen beurteilen zu können. Auch in dieser Studie war diese Methode geplant, da der verwendete Antikörper jedoch nicht gebunden hat, war die Auszählung der Zellen nicht möglich. In anderen Studien konnte so bereits ein Verlust von retinalen Ganglienzellen nach

Immunisierung mit Hitzeschockprotein 27, Hitzeschockprotein 60 (Joachim et al., 2009; Wax et al., 2008), Myelin basischem Protein, Glia fibrillärem saurem Protein, Vimentin und Sehnerv-Homogenat (Reichmann et al., 2008) nachgewiesen werden. Der stärkste Verlust hat dabei in temporalen Anteilen der Retina neben der Area centralis stattgefunden. Dies weist Ähnlichkeiten zu den Läsionen bei Patienten mit Normaldruckglaukom auf (Wax et al., 2008). Die Papille der entnommenen Augen könnte mikroskopisch untersucht werden. So wäre es möglich eine minimale Exkavation, die bei der Fundusuntersuchung nicht sichtbar war, noch im Nachhinein festzustellen. Des Weiteren könnten auch die Axone im Sehnerv ausgezählt werden, um zu überprüfen, ob der Verlust der retinalen Ganglienzellen mit einem Axonverlust einhergeht.

Außerdem könnten Immunglobulinablagerungen in der Retina oder dem Sehnerv nachgewiesen werden. Wie in der Einleitung beschrieben gehören diese zu den klassischen Zeichen einer Autoimmunerkrankung. Bei einem Normaldruckglaukom-Patienten konnten post mortem bereits solche Immunglobulin G und A Ablagerungen nachgewiesen werden (Wax et al., 1998b). Sollte es sich in weiteren Studien zeigen, dass nur Ablagerungen solcher Immunglobuline zum Untergang von retinalen Ganglienzellen führen können, wäre eine Booster-Immunisierung, bei der die Immunisierung nach einem gewissen Zeitraum wiederholt wird, in nachfolgenden Versuchen unerlässlich.

Da verschiedene Studien bereits bewiesen haben, dass sogar T-Zellen aktiviert durch nicht-neurale Antigene in einer neurodegenerativen Erkrankung mit autoimmuner Komponente beteiligt sein können (Lington et al., 1988; Andersen et al., 1993), sollte die Verteilung von T-Zellen in der Retina untersucht werden. In den Versuchen von Wax mit Hitzeschockprotein 27 und Hitzeschockprotein 60 haben sich dabei bereits Ergebnisse ergeben, die diesbezüglich Ähnlichkeiten zu Ergebnissen von Tiermodellen mit erhöhtem Augeninnendruck zeigten. Außerdem hatten T-Zellen, die aus Tieren mit erhöhtem Augeninnendruck isoliert wurden, eine verstärkte Antwort auf retinale Proteine und ihr Transfer verursachte neuronale Verletzung (Tezel et al., 2009). Normalerweise ist der Übertritt von Leukozyten in das Zentralnervensystem sehr stark reguliert und nur ein geringer Anteil an Molekülen, der durch bestimmte Oberflächenenzyme und Adhäsionsmoleküle ausgezeichnet ist, kann die bereits beschriebenen Schranken der Blut-Hirn-Schranke passieren (Xu et al., 2004; Crane et al., 2006). Aber in den verwandten Modellen der Experimentellen Autoimmun Uveitis und Experimentellen Autoimmun Enzephalitis ist bereits der

Mechanismus über eine T-Zellbeteiligung nachgewiesen und es wird schon an möglichen Therapien dieser Erkrankungen mittels T-Zell-Rezeptormodulation gearbeitet (Kawano et al., 1991).

Ebenfalls von Interesse ist ein so genannter Transferversuch. Sollte sich nämlich zeigen, dass die von einer Gruppe gebildeten Antikörper auf der Retina von gesunden Tieren in einem in vitro Versuch zu Verlusten von retinalen Ganglienzellen führen würden, wäre die Reaktivität der Antikörper bewiesen.

Zudem könnten selbstverständlich auch noch verschiedene andere Antikörper erprobt werden. In den Serum- und Kammerwasser-Analysen menschlicher Patienten haben sich verschiedene Peaks gezeigt. Da schon einige Antikörper gegen weitere Strukturen der Retina und des Sehnervs bekannt sind, könnte es sich durchaus lohnen, auch andere Antikörper zu erproben. Auch Kombinationen verschiedener Antikörper könnten untersucht werden, denn es ist nicht ausgeschlossen, dass sich dabei nicht nur additive, sondern auch noch stärkere Effekte ergeben.

In den Analysen haben sich bei den Glaukompatienten neben Auto-Antikörpern, die erhöht waren, auch Auto-Antikörper gezeigt, welche erniedrigt waren. Ob die erniedrigten Antikörper eventuell schützende Eigenschaften auf die retinalen Ganglienzellen ausüben können, muss geprüft werden. Dazu ist denkbar, die Antikörper erkrankten Tieren mit Verlusten von retinalen Ganglienzellen zu verabreichen und zu überprüfen, ob die Verluste danach eventuell ausbleiben. Es gibt Autoren, die besonders hinter diesen Antikörper einen viel versprechenden Therapieansatz vermuten. In diesem Zusammenhang wird von einer „Impfung“ gegen das Glaukom gesprochen bzw. von einer Boosterung der neuroprotektiven Immunität.

Des Weiteren könnte in nachfolgenden Studien einer Gruppe nur Freundes Adjuvant und Pertussistoxin in gleicher Konzentration wie den immunisierten Tieren verabreicht werden. So lässt sich eine Beeinflussung dieser beiden Substanzen auf eine eventuell stattgehabte Immunreaktion ausschließen.

7. Zusammenfassung

Das Glaukom ist eine der führenden Erblindungsursachen weltweit. Trotzdem ist die Pathogenese, die zur Degeneration der retinalen Ganglienzellen führt, bisher nicht verstanden. In den letzten Jahren ergaben sich verschiedene Hinweise auf die Beteiligung einer immunologischen Komponente.

Thema dieser Arbeit waren elektrophysiologische Untersuchungen, im Sinne von visuell evozierten Potentialen, am Tiermodell des Experimentellen Autoimmun Glaukoms und die Etablierung dieses Modells. Das Modell basiert auf einer Immunisierung von Lewisratten mit Pertussistoxin, inkompletten Freund's Adjuvant und potentiellen Antigenen, die zu einer Immunreaktion und einem Verlust von retinalen Ganglienzellen führen sollen.

Zur Etablierung des Experimentellen Autoimmun Glaukom Modells wurde eine fünfwöchige Studie mit vier Gruppen durchgeführt. Als Antigene wurden Glia fibrilläres saures Protein (n= 10) und Myelin basisches Protein (n=10) verwendet, die beide in Studien zu Serum- und Kammerwasseranalysen bei Glaukompatienten eine Abweichung zur Kontrollgruppe gezeigt hatten. Außerdem wurde eine Gruppe mit selbst hergestelltem Sehnerv-Homogenat (n=12) immunisiert. Eine Gruppe erhielt keine Immunisierung und diente als Kontrolle (n=10).

Zur Überprüfung der Effekte des Modells dienten verschiedene Untersuchungsmethoden, wie die Augeninnendruckmessung und die Untersuchung der Fundi. Des Weiteren wurden transiente und stationäre visuell evozierte Potentiale abgeleitet und die Latenzen, Amplituden und die Marker S (Steigung) und TR (Temporale Antworten) verglichen. Außerdem erfolgte nach Tötung der Tiere die Entnahme der Gehirne und Augen. Die Gehirne wurden nach Paraffineinbettung geschnitten, mit Luxol Fast Blue und Kresylviolett gefärbt und hinsichtlich etwaiger Entmarkungsherde oder anderer Pathologien unter dem Mikroskop bewertet.

Der Verlauf des intraokulären Drucks zeigte sowohl zwischen den Gruppen als auch zwischen den verschiedenen Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede. Er bewegte sich im physiologischen Bereich mit durchschnittlich circa 12 mmHg. Die Funduskopien lieferten zu keinem Zeitpunkt krankhafte Veränderungen. Auch die visuell evozierten Potentiale lieferten zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede, sondern belegten normale visuelle Funktion bei allen Tieren. Die Auswertung der histologischen Untersuchung der Hirnschnitte zeigte keine Entmarkungsherde.

Die erzielten Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass der retinale Ganglienzellverlust beim Experimentellen Autoimmun Glaukom Modell ohne eine Augeninnendruckerhöhung stattfindet. Die Fundusuntersuchung und die visuell evozierten Potentiale, wie in diesem Versuchsaufbau durchgeführt, scheinen nicht sensibel genug zu sein, diese Verluste nachzuweisen.

In weiteren Arbeiten sollten andere Methoden zum Nachweis der retinalen Ganglienzellverluste erprobt werden. Neben elektrophysiologischen Methoden bieten sich für das weitere Vorgehen besonders immunhistologische Methoden an. Außerdem sollten die Mechanismen erforscht werden durch die es nach der Immunisierung zur Apoptose von retinalen Ganglienzellen kommt und welche Antikörper dazuführen können. Des Weiteren ist von Interesse, ob und wie eine zelluläre Komponente an der Pathogenese des Experimentellen Autoimmun Glaukoms beteiligt ist.

8. Literaturverzeichnis

Adamus G., Sugden B., Shiraga S., Timmers A.M., Hauswirth W.W. (2003) Anti-apoptotic effects of CNTF gene transfer on photoreceptor degeneration in experimental antibody-induced retinopathy. *J Autoimmun*; 21(2):121-9.

Anderson D.R., Hendrickson A. (1974) Effect of intraocular pressure on rapid axoplasmic transport in monkey optic nerve. *Invest Ophthalmol*; 13(10):771-83.

Andersen O., Lygner P.E., Bergström T., Andersson M., Vahlne A. (1993) Viral infections trigger multiple sclerosis relapses: a prospective seroepidemiological study. *J Neurol*; 240(7):417-22.

Ansorge S. (2007) Immunsystem. S.1103-1140. In: Löffler G., Petrides P.E. *Biochemie und Pathobiochemie*. 8.Auflage. Springer Verlag, Berlin.

Antal A., Aita J.F., Bodis-Wollner I. (2001) The paracentral visual field in multiple sclerosis: evidence for a deficit in interneuronal spatial summation? *Vision Res*; 41:1735-1742.

Araie M. (1995) Pattern of visual field defects in normal-tension and high-tension glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol*; 6(2):36-45.

Augustin A.J., Loeffler K.U., Sekundo W., Grus F.H., Lutz J. (1999) Effects of systemically applied allopurinol and prednisolon on experimental autoimmune uveitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*; 237(6):508-12.

Bach M., Meigen T. (1999) Do's and don'ts in Fourier analysis of steady-state potentials. *Doc Ophthalmol*; 99(1):69-82.

Bach M., Unsoeld A.S., Philippin H., Staubach F., Maier P., Walter H.S., Bomer T.G., Funk J. (2006) Pattern ERG as an early glaucoma indicator in ocular hypertension: a long-term, prospective study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 47(11):4881-7.

Bakalash S., Kipnis J., Yoles E., Schwartz M. (2002) Resistance of retinal ganglion cells to an increase in intraocular pressure is immune-dependent. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 43(8):2648-53.

Bakalash S., Kessler A., Mizrahi T., Nussenblatt R., Schwartz M. (2003) Antigenic specificity of immunoprotective therapeutic vaccination for glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 44:3374-3381.

Barron K.D. (1995) The microglial cell. A historical review. *J Neurol Sci*; 134:57-68.

Beeton C., Garcia A., Chandy K.G. (2007) Induction and clinical scoring of chronic-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Vis Exp*; (5):224.

Ben-Shlomo G., Ofri R. (2006) Development of inner retinal function, evidenced by the pattern electroretinogram, in the rat. *Exp Eye Res*; 83(2):417-23.

Benson J.L., Niederkorn J.Y. (1992) Immune privilege in the anterior chamber of the eye: alloantigens and tumor-specific antigens presented into the anterior chamber

simultaneously induce suppression and activation of delayed hypersensitivity to the respective antigens. *Immunology*; 77:189-195.

Berger T., Rubner P., Schautzer F., Egg R., Ulmer H., Mayringer I., Dilitz E., Deisenhammer F., Reindl M. (2003) Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med*; 10; 349(2):139-45.

Bilbool N., Kaitz M., Feinsod M., Soffer D., Abramsky O. (1983) Visual evoked potentials in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neurol Sci*; 60(1):105-15.

Bodis-Wollner I., Hendley C.D., Mylin L.H., Thornton J. (1979) Visual evoked potentials and the visuogram in multiple sclerosis. *Annals of neurology*; 5:40-47.

Bonomi L., Marchini G., Marraffa M., Morbio R. (2001) The relationship between intraocular pressure and glaucoma in a defined population. Data from the Egna-Neumarkt Glaucoma Study. *Ophthalmologica*; 215:34-38.

Bora N.S., Kim M.C., Kabeer N.H., Simpson S.C., Tandhasetti M.T., Ciritto T.P., Kaplan A.D., and Kaplan H.J. (1995) Experimental anterior autoimmune uveitis. Induction with melanin-associated antigen from the iris and ciliary body. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 36:1056-66.

Brankack J., Klingberg F. (1990) Permanent changes of the visually evoked responses in the superior colliculus after early postnatal treatment with monosodium-L-glutamate. *Biomed Biochim Acta*; 49:481-487.

Bray L.C., Mitchell K.W., Howe J.W. (1991) Prognostic significance of the pattern visual evoked potential in ocular hypertension. *Br J Ophthalmol*; 75(2):79-83.

Breton M.E., Wilson T.W., Wilson R., Spaeth G.L., Krupin T. (1991) Temporal contrast sensitivity loss in primary open-angle glaucoma and glaucoma suspects. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 32:2931-2941.

Bringmann A., Klingberg F. (1995) Behavior-dependent and drug-induced changes of rat visual evoked potential: relation to the EEG spectral power. *Neuropsychobiology*; 31:89-97.

Brückener K.E., el Bayâ A., Galla H.J., Schmidt M.A. (2003) Permeabilization in a cerebral endothelial barrier model by pertussis toxin involves the PKC effector pathway and is abolished by elevated levels of cAMP. *J Cell Sci* 1; 116(Pt 9):1837-46.

Büchi E.R., Suivaizdis I., Fu J. (1991) Pressure-induced retinal ischemia in rats: an experimental model for quantitative study. *Ophthalmologica*; 203(3):138-47.

Caspi R.R. (2003) Experimental autoimmune uveoretinitis in the rat and mouse. *Curr Protoc Immunol.*; Chapter 15:Unit 15.6.

Celesia G.G., Brigell M.G. (1999) Recommended standards for pattern electroretinograms and visual evoked potentials. *The International Federation of Clinical Neurophysiology. Electrencephalogr Clin Neurophysiol Suppl*; 52:53-67.

Chamczuk A.J., Ursell M., O'Connor P., Jackowski G., Moscarello M.A. (2002) A rapid ELISA-based serum assay for myelin basic protein in multiple sclerosis. *J Immunol Methods*; 1; 262(1-2):21-7.

Chen H., Weber A.J. (2002) Expression of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase by Müller cells after optic nerve damage and intravitreal application of brain-derived neurotrophic factor. *Glia*; 15; 38(2):115-25.

Chen J., Lee L. (2007) Clinical applications and new developments of optical coherence tomography: an evidence-based review. *Clin Exp Optom*; 90(5):317-35.

Chung L., Utz P.J. (2004) Antibodies in scleroderma: direct pathogenicity and phenotypic associations. *Curr Rheumatol Rep*; 6(2):156-63.

Classen M., Diehl V., Kochsiek K., Schmiegel W. (2004) *Klinische Immunologie*. S.213-226. Herausgeber: Berdel W.E., Böhm M. Differentialdiagnose Innere Medizin. Elsevier, Urban und Fischer, München.

Colotto A., Falsini B., Salgarello T., Iarossi G., Galan M.E., Scullica L. (2000) Photopic negative response of the human ERG: losses associated with glaucomatous damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 41(8):2205-11.

Crane I.J., Xu H., Wallace C., Manivannan A., Mack M., Liversidge J., Marquez G., Sharp P.F., Forrester J.V. (2006) Involvement of CCR5 in the passage of Th1-type cells across the blood-retina barrier in experimental autoimmune uveitis. *J Leukoc Biol*; 79(3):435-43.

Danias J., Shen F., Kavalarakis M., Chen B., Goldblum D., Lee K., Zamora M.F., Su Y., Brodie S.E., Podos S.M., Mittag T. (2006) Characterization of retinal damage in the episcleral vein cauterization rat glaucoma model. *Exp Eye Res*; 82(2):219-28.

Davis, J.A. (1999) Assessment of discomfort in an animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Animal Welfare Information Center Bulletin*, Volume 10:92.

Deguchi K., Takeuchi H., Miki H., Yamada A., Touge T., Terada S., Nishioka M. (1992) Electrophysiological follow-up of acute and chronic experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*; 242(1):1-5.

Detry-Morel M., Zeyen T., Kestelyn P., Collignon J., Goethals M. (2004) Screening for glaucoma in a general population with the non-mydratic fundus camera and the frequency doubling perimeter. *European Journal of Ophthalmology*; 14:387-393.

Devaux B., Enderlin F., Wallner B., Smilek D.E. (1997) Induction of EAE in mice with recombinant human MOG, and treatment of EAE with a MOG peptide. *J Neuroimmunol*; 75(1-2):169-73.

Dibas A., Yang M.H., He S., Bobich J., Yorio T. (2008) Changes in ocular aquaporin-4 (AQP4) expression following retinal injury. *Mol Vis* 25; 14:1770-83.

Diehl K.H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.M., van de Vorstenbosch C.; European Federation of Pharmaceutical Industries

Association and European Centre for the Validation of Alternative Methods. (2001) A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol*; 21(1):15-23.

Diem R., Demmer I., Boretius S., Merkler D., Schmelting B., Williams S.K., Sättler M.B., Bähr M., Michaelis T., Frahm J., Brück W., Fuchs E. (2008) Autoimmune optic neuritis in the common marmoset monkey: comparison of visual evoked potentials with MRI and histopathology. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 49(8):3707-14.

Dreyer E.B., Zurakowski D., Schumer R.A., Podos S.M., Lipton S.A. (1996) Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. *Arch Ophthalmol*; 114: 299-305.

Dziewas R., Kis B., Grus F.H., Zimmermann C.W. (2001) Antibody pattern analysis in the Guillain-Barre syndrome and pathologic controls. *Journal of Neuroimmunology*; 119:287-296.

Emre M., Orgül S., Gugleta K., Flammer J. (2004) Ocular blood flow alteration in glaucoma is related to systemic vascular dysregulation. *Br J Ophthalmol*; 88(5):662-6.

Erlanger B.F. (1989) Some thoughts on the structural basis of internal imagery. *Immunol Today*; 10:151–152.

EUGS (2003) Terminology and Guidelines for Glaucoma. Einführungskapitel. 2. Auflage. European Glaucoma Society, London.

Ferrarini A.M., Sivieri S., Bulian P., Buttarello M., Biasi G., Tavolato B., Gallo P. (1998) Time-course of interleukin-2 receptor expression in interferon beta-treated multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*; 84:213–217.

Fisher J., Levkovitch-Verbin H., Schori H., Yoles E., Butovsky O., Kaye J.F., Ben-Nun A., Schwartz M. (2001) Vaccination for neuroprotection in the mouse optic nerve: implications for optic neuropathies. *J Neurosci*; 21:136–142.

Flammer J., Orgül S., Costa V.P., Orzalesi N., Kriegelstein G.K., Serra L.M., Renard J.P., Stefánsson E. (2002) The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Progress in Retinal and Eye Research*; 21:359-393.

Gorczyca W.A., Ejma M., Witkowska D., Misiuk-Hojlo M., Kuropatwa M., Mulak M., Szymaniec S. (2004) Retinal antigens are recognized by antibodies present in sera of patients with multiple sclerosis. *Ophthalmic Research*; 36:120-123.

Gordon M.O., Beiser J.A., Brandt J.D., Heuer D.K., Higginbotham E.J., Johnson C.A., Keltner J.L., Miller J.P., Parrish R.K. 2nd, Wilson M.R., Kass M.A. (2002) The Ocular Hypertension Treatment Study: baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol*.; 120:714–720; Discussion 829–830.

Gramlich O.W., Joachim S.C., Reichmann J., Pfeiffer N., Grus F.H. (2008) Komplexes Proteinprofil im Kammerwasser beim Experimentellen Autoimmunen Glaukom-Tiermodell (EAG). 106. DOG-Kongress am 18.09.2008.

Gramlich O.W., Joachim S.C., Gottschling P.F., Cuny C.S., Stahl V., Laspas P., Pfeiffer N., Grus F.H. (2009) Ablagerungen von Antikörpern in der Retina korrelieren mit dem Verlust von retinalen Ganglienzellen bei Tieren mit Experimentellen Autoimmun Glaukom. 107. DOG-Kongress am 24.09.2009.

Graus Y.M., De Baets M.H. (1993) Myasthenia gravis: an autoimmune response against the acetylcholine receptor. *Immunol Res*; 12:78–100.

Gregerson D.S., Merryman C.F., Obritsch W.F., Donoso L.A. (1990) Identification of a potent new pathogenic site in human retinal S-antigen which induces experimental autoimmune uveoretinitis in Lewis rats. *Cell Immunol*; 128:209-19.

Grehn F. (2007a) Untersuchungsmethoden des Ophthalmologen. S.29-53. *Augenheilkunde*. 30.Auflage. Springer Verlag, Berlin.

Grehn F. (2007b) Glaukom. S.295-318. *Augenheilkunde*. 30.Auflage. Springer Verlag, Berlin.

Grus F.H., Augustin A.J., Koch F., Zimmermann C.W. (1996) Autoantibody repertoires in animals with lens-induced uveitis after different therapies using megablot technique: A Comparison. *Advances in Therapy*; 13:203-215.

Grus F.H., Augustin A.J., Toth-Sagi K., Koch F. (1997a) Detection and evaluation of the IgG autoantibody repertoire against human skeletal muscle antigens in Graves' disease using the "MegaBlot" technique. *Advances in Therapy*; 14:8-13.

Grus F.H., Augustin A.J., Zimmermann C.W. (1997b) Computer-supported analysis (MegaBlot) of allopurinol-induced changes in the autoantibody repertoires of rats suffering from experimental lens-induced uveitis. *Electrophoresis*; 18:516-519.

Grus F.H., Augustin A.J., Loeffler K., Dick B., Lutz J., Pfeiffer N. (2001) Allopurinol has immunomodulating activity following topical and systemic application in experimental autoimmune uveitis. *Eur J Ophthalmol*; 11(3):252-60.

Grus F.H., Joachim S.C., Hoffmann E.M., Pfeiffer N. (2004) Complex autoantibody repertoires in patients with glaucoma. *Mol Vis*; 10:132–137.

Grus F.H., Joachim S.C., Bruns K., Lackner K.J., Pfeiffer N., Wax M.B. (2006) Serum autoantibodies to alpha-fodrin are present in glaucoma patients from Germany and the United States. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 47:968–976.

Grus F.H., Joachim S.C., Wuenschig D., Rieck J., Pfeiffer N. (2008) Autoimmunity and glaucoma. *J Glaucoma*; 17(1):79-84.

Guarino I., Loizzo S., Lopez L., Fadda A., Loizzo A. (2004) A chronic implant to record electroretinogram, visual evoked potentials and oscillatory potentials in awake, freely moving rats for pharmacological studies. *Neural Plast*; 11:241-250.

Gugleta K. (2009) Vascular risk factors in glaucoma – diagnostics. *Praxis Bern*; 98(4):201-7.

Guo L., Li Y., Lin H., Ji X., Li J., Que L., Zhang Y., Rong Y., Wang J. (2004). Evaluation of a rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis with human MBP as antigen. *Cell Mol Immunol*; 1(5): 387-91.

Guo L., Tsaturian V., Luong V., Podoleanu A.G., Jackson D.A., Fitzke F.W., Cordeiro M.F. (2005) En face optical coherence tomography: a new method to analyse structural changes of the optic nerve head in rat glaucoma. *Br J Ophthalmol*; 89(9):1210-6.

Haefliger I.O., Fleischhauer J., Flammer J. (2000) In glaucoma, should enthusiasm about neuroprotection be tempered by the experience obtained in other neurodegenerative disorders? *Eye (London, England)*; 14(Pt 3B):464-472.

Halliday A.M. (1976) Visually evoked responses in optic nerve disease. *Trans Ophthalmol Soc UK*; 96(3):372-76.

Harju M., Vesti E. (2001) Blood flow of the optic nerve head and peripapillary retina in exfoliation syndrome with unilateral glaucoma or ocular hypertension. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*; 239:271-277.

Hart W.M.Jr., Becker B. (1982) The onset and evolution of glaucomatous visual field defects. *Ophthalmology*; 89(3):268-79.

Holopigian K., Seiple W., Mayron C., Koty R., Lorenzo M. (1990) Electrophysiological and psychophysical flicker sensitivity in patients with primary open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 31:1863-1868.

Hueber W., Utz P.J., Robinson W.H. (2003) Autoantibodies in early arthritis: advances in diagnosis and prognostication. *Clinical and Experimental Rheumatology*; 21:59-64.

Hughes B.W., Moro De Casillas M.L., Kaminski H.J. (2004) Pathophysiology of myasthenia gravis. *Semin Neurol*; 24:21-30.

Ikeda Y., Maruyama I., Nakazawa M., Ohguro H. (2002) Clinical significance of serum antibody against neuron-specific enolase in glaucoma patients. *Jpn J Ophthalmol*; 46:13-17.

Ishida K., Yamamoto T., Sugiyama K., Kitazawa Y. (2000) Disk hemorrhage is a significantly negative prognostic factor in normal-tension glaucoma. *American Journal of Ophthalmology*; 129:707-714.

Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M.J. (2002) Autoimmunität und Transplantationen. S.537-560. In: Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M.J. (Hrsg.) *Immunologie*. 5.Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg und Berlin.

Jehle T., Wingert K., Dimitriu C., Meschede W., Lasseck J., Bach M., Lagrèze W.A. (2008) Quantification of ischemic damage in the rat retina: a comparative study using evoked potentials, electroretinography, and histology. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 49(3):1056-64.

Jehle T., Ehlken D., Wingert K., Feuerstein T.J., Bach M., Lagrèze W.A. (2009) Influence of narcotics on luminance and frequency modulated visual evoked potentials in rats. *Doc Ophthalmol*; 118(3):217-24.

Jeoung J.W., Park K.H., Kim J.M., Kang S.H., Kang J.H., Kim T.W., Kim D.M. (2008) Optic disc hemorrhage may be associated with retinal nerve fiber loss in otherwise normal eyes. *Ophthalmology*; 115(12):2132-40.

Joachim S.C., Grus F.H., Pfeiffer N. (2003) Analysis of autoantibody repertoires in sera of patients with glaucoma. *Eur J Ophthalmol*; 13:752–758.

Joachim S.C., Pfeiffer N., Grus F.H. (2005) Autoantibodies in patients with glaucoma: a comparison of IgG serum antibodies against retinal, optic nerve, and optic nerve head antigens. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*; 243:817–823.

Joachim S.C., Bruns K., Lackner K.J., Pfeiffer N., Grus F.H. (2007a) Analysis of IgG antibody patterns against retinal antigens and antibodies to alpha-crystallin, GFAP, and alpha-enolase in sera of patients with "wet" age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*; 245(5):619-26.

Joachim S.C., Bruns K., Lackner K., Pfeiffer N., Grus F.H. (2007b) Antibodies to aB-crystallin, vimentin, and heat shock protein 70 in aqueous humor of patients with normal tension glaucoma and IgG antibody patterns against retinal antigen in aqueous humor. *Curr Eye Res*; 32:501–509.

Joachim S.C., Wuenschig D., Pfeiffer N., Grus F.H. (2007c) IgG antibody patterns in aqueous humor of patients with primary open angle glaucoma and pseudoexfoliation glaucoma. *Mol Vis*; 5; 13:1573-9.

Joachim S.C., Reichelt J., Berneiser S., Pfeiffer N., Grus F.H. (2008) Sera of glaucoma patients show autoantibodies against myelin basic protein and complex autoantibody profiles against human optic nerve antigens. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*; 246(4):573-80.

Joachim S.C., Grus F.H., Kraft D., White-Farrar K., Barnes G., Barbeck M., Ghanaati S., Cao S., Li B., Wax M.B. (2009) Complex Antibody Profile Changes in an Experimental Autoimmune Glaucoma Animal Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 50(10):4734-42.

Johnson E.C., Morrison J.C. (2009) Friend or foe? Resolving the impact of glial responses in glaucoma. *J Glaucoma*; 18(5):341-53.

Johnson M.A., Drum B.A., Quigley H.A., Sanchez R.M., Dunkelberger G.R. (1989) Pattern-evoked potentials and optic nerve fiber loss in monocular laser-induced glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 30(5):897-907.

Kawano Y., Sasamoto Y., Kotake S., Thurau S.R., Wiggert B., Gery I. (1991) Trials of vaccination against experimental autoimmune uveoretinitis with a T-cell receptor peptide. *Curr Eye Res*; 10(8):789-95.

Khan N., Huang J.J., Foster C.S. (2006) Cancer associated retinopathy (CAR): An autoimmune-mediated paraneoplastic syndrome. *Semin Ophthalmol*; 21(3):135-41.

- Kamradt T., Soloway P.D., Perkins D.L., Geffer M.L. (1991) Pertussis toxin prevents the induction of peripheral T cell anergy and enhances the T cell response to an encephalitogenic peptide of myelin basic protein. *J Immunol*; 147:3296-302.
- Kang S.Y., Kang J.H., Choi J.C., Lee J.S., Lee C.S., Shin T. (2009) Expression of erythropoietin in the spinal cord of lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Neurol*; 5(1):39-45.
- Kaplan H.J., Streilein J.W. (1977) Immune response to immunization via anterior chamber of the eye. I. F. lymphocyte-induced immune deviation. *Journal of Immunology*; 118:809-814.
- Kipnis J., Yoles E., Schori H., Hauben E., Shaked I., Schwartz M. (2001) Neuronal survival after CNS insult is determined by a genetically encoded autoimmune response. *J Neurosci*; 21:3740-48.
- Klein B.E., Klein R., Sponsel W.E., Franke T., Cantor L.B., Martone J., Menage M.J. (1992) Prevalence of glaucoma. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*; 99(10):1499-504.
- Klistorner A., Graham S.L., Martins A., Grigg J.R., Arvind H., Kumar R.S., James A.C., Billson F.A. (2007) Multifocal blue-on-yellow visual evoked potentials in early glaucoma. *Ophthalmology*; 114(9):1613-21.
- Kohler H., Bayry J., Nicoletti A., Kaveri S. V. (2003) Natural autoantibodies as tools to predict the outcome of immune response? *Scandinavian Journal of Immunology*; 58:285-289.
- Kong G.Y., Van Bergen N.J., Trounce I.A., Crowston J.G. (2009) Mitochondrial dysfunction and glaucoma. *J Glaucoma*; 18(2):93-100.
- Kountouras J., Mylopoulos N., Boura P., Bessas C., Chatzopoulos D., Venizelos J., Zavos C. (2001). Relationship between *Helicobacter pylori* infection and glaucoma. *Ophthalmology*; 108:599-604.
- Kremmer S., Kreuzfelder E., Klein R., Bontke N., Henneberg-Quester K.B., Steuhl K.P., Grosse-Wilde H. (2001) Antiphosphatidylserine antibodies are elevated in normal tension glaucoma. *Clin Exp Immunol*; 125:211–215.
- Kulberg A.Y. (1999) Immunoglobulins and antibodies. *Russ J Immunol*; 4:241–242.
- Lacroix-Desmazes S., Kaveri S.V., Mouthon L., Ayouba A., Malanchère E., Coutinho A., Kazatchkine M.D. (1998) Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *Journal of Immunological Methods*; 216:117-137.
- Lam T.T., Kwong J.M., Tso M.O. (2003) Early glial responses after acute elevated intraocular pressure in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 44(2):638-45.
- Lassmann H. (2007) Experimental models of multiple sclerosis. *Rev Neurol*; 163(6-7):651-5.

Leuner K., Hauptmann S., Abdel-Kader R., Scherping I., Keil U., Strosznajder J.B., Eckert A., Müller W.E. (2007) Mitochondrial dysfunction: the first domino in brain aging and Alzheimer's disease? *Antioxid Redox Signal*; 9(10):1659-75.

Levokovitch-Verbin H., Quigley H.A., Martin K.R., Valenta D., Baumrind L.A., Pease M.F. (2002) Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 43(2):402-10.

Li B., Pang I.H., Barnes G., McLaughlin M., Holt W. (2002) A new method and device to induce transient retinal ischemia in the rat. *Curr Eye Res*; 24(6):458-64.

Lim E.T., Berger T., Reindl M., Dalton C.M., Fernando K., Keir G., Thompson E.J., Miller D.H., Giovannoni G. (2005) Anti-myelin antibodies do not allow earlier diagnosis of multiple sclerosis. *Mult Scler*; 11(4):492-4.

Linington C., Bradl M., Lassmann H., Brunner C., Vass K. (1988) Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Am J Pathol*; 130(3):443-54.

Maeda K., Sawada A., Matsubara M., Nakai Y, Hara A, Yamamoto T. (2004) A novel neuroprotectant against retinal ganglion cell damage in a glaucoma model and an optic nerve crush model in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 45(3):851-6.

Mannie M., Swanborg R.H., Stepaniak J.A. (2009) Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat. *Curr Protoc Immunol*; Chapter 15:Unit 15.2.

Mariotti S., Caturegli P., Barbesino G., Marinò M., Del Prete G.F., Chiovato L., Tonacchera M., De Carli M., Pinchera A. (1992) Thyroid function and thyroid autoimmunity independently modulate serum concentration of soluble interleukin 2 (IL-2) receptor (sIL-2R) in thyroid diseases. *Clin Endocrinol*; 37:415–422.

Martin L.J. (2006) Mitochondriopathy in Parkinson disease and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*; 65(12):1103-10.

Martus P., Jünemann A., Wisse M., Budde W.M., Horn F., Korth M., Jonas J.B. (2000) Multivariate approach for quantification of morphologic and functional damage in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 41:1099-1110.

Maruyama I., Ohguro H., Ikeda Y. (2000) Retinal ganglion cells recognized by serum autoantibody against gamma-enolase found in glaucoma patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 41:1657–1665.

Matsumoto Y. (2000) Characterization of T cell receptor (TCR) of organ-specific autoimmune disease-inducing T cells and TCR-based immunotherapy with DNA vaccines. *J Neuroimmunol* 2; 110(1-2):1-12.

Maurer K., Lowitzsch K., Stöhr M. (1988) Visuell evozierte Potentiale. S.67-129. Evozierte Potentiale, AEP – VEP – SEP, Atlas mit Einführungen. Enke Verlag, Stuttgart.

- Maurer K., Lang N., Eckert J. (2005) Visuell evozierte Potentiale. S.227-276. Praxis der evozierten Potentiale SEP – AEP – MEP – VEP. Steinkopf Verlag, Darmstadt.
- Mermoud A., Baerveldt G., Minckler D.S., Lee M.B., Rao N.A. (1994) Intraocular pressure in Lewis rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 35:2455-2460.
- Michelson G., Langhans M.J., Harazny J., Dichtl A. (1998) Visual field defect and perfusion of the juxtapapillary retina and the neuroretinal rim area in primary open-angle glaucoma. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*; 236:80-85.
- Minckler D.S., Tso M.O., Zimmerman L.E. (1976) A light microscopic, autoradiographic study of axoplasmic transport in the optic nerve head during ocular hypotony, increased intraocular pressure, and papilledema. *Am J Ophthalmol*; 82(5):741-57.
- Mochizuki M., Sugita S., Ishikawa N., Watanabe T. (2000) Immunoregulation by aqueous humor. *Cornea*; 19:24-25.
- Moore C.G., Milne S.T., Morrison J.C. (1993) Noninvasive measurement of rat intraocular pressure with the Tono-Pen. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 34(2):363-9.
- Mouthon L., Haury M., Lacroix-Desmazes S., Barreau C., Coutinho A., Kazatchkine M.D. (1995) Evidence that IgG autoantibodies of healthy adults recognize a limited and conserved set of protein antigens in homologous tissues. *The Journal of Immunology*; 154:5769-5778.
- Munoz J.J., Sewell W.A. (1984) Effect of pertussigen on inflammation caused by Freund adjuvant. *Infect Immun*; 44(3):637-41.
- Musch D.C., Gillespie B.W., Lichter P.R., Niziol L.M., Janz N.K.; CIGTS Study Investigators. (2009) Visual field progression in the Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study the impact of treatment and other baseline factors. *Ophthalmology*; 116(2):200-7.
- Nakayama M., Tobimatsu S., Tashima-Kurita S., Kato M., Inomata H. (1993) The variation of human contrast sensitivity with age and optic nerve disease. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*; 97:403-410.
- Neufeld A.H. (1999) Microglia in the optic nerve head and the region of parapapillary chorioretinal atrophy in glaucoma. *Arch Ophthalmol*; 117(8):1050-6.
- Nguyen S.M., Alexejun C.N., Levin L.A. (2003). Amplification of a reactive oxygen species signal in axotomized retinal ganglion cells. *Antioxid Redox Signal*; 5:629-634.
- Nicklas W., Cußler K., Hartinger J. (1997). Tierschutzaspekte bei der Immunisierung von Versuchstieren. *Merkblatt 4. Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz e.V.*
- Nijenhuis S., Zendman A.J., Vossenaar E.R., Pruijn G.J., Vanvenrooij W.J. (2004) Autoantibodies to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis: clinical performance and biochemical aspects of an RA-specific marker. *Clinica Chimica Acta*; 350:17-34.

Nobrega A., Haury M., Grandien A., Malanchere E., Sundblad A., Coutinho A. (1993) Global analysis of antibody repertoires. II. Evidence for specificity, self-selection and the immunological "homunculus" of antibodies in normal serum. *European Journal of Immunology*; 23:2851-2859.

Odoardi F., Kawakami N., Klinkert W.E., Wekerle H., Flügel A. (2007) Blood-borne soluble protein antigen intensifies T cell activation in autoimmune CNS lesions and exacerbates clinical disease. *Proc Natl Acad Sci USA*; 20; 104(47):18625-30.

Ohguro H., Ogawa K., Maeda T., Maeda A., Maryyama I. (1999) Cancer-associated retinopathy induced by both anti-recoverin and anti-hsc70 antibodies in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 40:3160-7.

Osborne N.N., Melena J., Childow G., Wood J.P. (2001) A hypothesis to explain ganglion cell death caused by vascular insults at the optic nerve head: possible implication for the treatment of glaucoma. *British Journal of Ophthalmology*; 85:1252-1259.

Oldstone M.B. (2005) Molecular mimicry, microbial infection, and autoimmune disease: evolution of the concept. *Current Topics in Microbiology and Immunology*; 296:1-17.

Ozden S., Kildaci B., Muftuoglu S., Cakar N., Yildirim C. (2001) Effect of trimetazidine on retinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Ophthalmologica*; 215(4):309-17.

Pache M., Dubler B., Flammer J. (2003) Peripheral vasospasm and nocturnal blood pressure dipping--two distinct risk factors for glaucomatous damage? *Eur J Ophthalmol*; 13(3):260-5.

Pang I.H., Clark A.F. (2007) Rodent models for glaucoma retinopathy and optic neuropathy. *J Glaucoma*; 16(5):483-505.

Paterson P.Y., Day E.D., Whitacre C.C., Berenberg R.A., Harter D.H. (1981) Endogenous myelin basic protein-serum factors (MBP-SFs) and anti-MBP antibodies in humans. Occurrence in sera of clinically well subjects and patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci*; 52(1):37-51.

Pease M.E., McKinnon S.J., Quigley H.A., Kerrigan-Baumrind L.A., Zack D.J. (2000) Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 41:764-774.

Pfeiffer N., Tillmon B., Bach M. (1993) Predictive value of the pattern electroretinogram in high-risk ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 34(5):1710-5.

Pfeiffer N. (2001) *Glaukom: Grundlagen – Diagnostik – Therapie - Compliance*. Pfeiffer N. (Hrsg.) Georg Thieme Verlag, Stuttgart und New York.

Pfeiffer N. (2005) Results of the "Ocular hypertension treatment study". *Ophthalmologe*; 102:230–234.

Pichler W.J., Peter H.H., Haensch M.G. (1996) Prinzipien des Immunsystems. S. 4-52. In: Peter H.H., Pichler W.J. (Hrsg.) Klinische Immunologie. 2.Auflage. Urban und Schwarzenberg, München, Wien and Baltimore.

Poeck K., Hacke W. (2001a) Evozierte Potentiale und Elektroenzephalographie. S.52-59. Neurologie. 11.Auflage. Springer Verlag, Berlin.

Poeck K., Hacke W. (2001b) Multiple Sklerose. S.503-516. Neurologie. 11.Auflage. Springer Verlag, Berlin.

Quigley H.A., Addicks E.M. (1980) Chronic experimental glaucoma in primates. II. Effect of extended intraocular pressure elevation on optic nerve head and axonal transport. Invest Ophthalmol Vis Sci; 19(2):137-52.

Quigley H.A. (1993) Open-angle glaucoma. N Engl J Med; 328:1097-1106.

Quigley H.A. (1996) Number of people with glaucoma worldwide. Br J Ophthalmol; 80:389-393.

Quigley H.A. (1999) Neuronal death in glaucoma. Progress in Retinal and Eye Research; 18:39-57.

Quigley H.A., Broman A.T. (2006) The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. Br J Ophthalmol; 90(3):262-7.

Ramos M., Alvarez I., Sesma L., Logean A., Rognan D., Lopez de Castro J.A. (2002) Molecular mimicry of an HLA-B27-derived ligand of arthritis-linked subtypes with chlamydial proteins. The Journal of biological chemistry; 277:37573-37581.

Reichelt J., Joachim S.C., Pfeiffer N., Grus F.H. (2008) Analysis of autoantibodies against human retinal antigens in sera of patients with glaucoma and ocular hypertension. Curr Eye Res; 33(3):253-61.

Reichmann J., Joachim S.C., Gramlich O.W., Pfeiffer N., Grus F.H. (2008) Retinaler Ganglienzellverlust durch Immunisierung mit Antigenen des Auges in einem Glaukومتiermodell. 106. DOG-Kongress am 18.09.2008.

Reindl M., Linington C., Brehm U., Egg R., Dilitz E., Deisenhammer F., Poewe W., Berger T. (1999) Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and other neurological diseases: a comparative study. Brain; 122 (11):2047-56.

Renz-Polster H., Krautzig S., Bätge B. (2008) Immunsystem S.354-386. Basislehrbuch Innere. 4.Auflage. Elsevier, Urban und Fischer, München.

Risau W., Esser S., Engelhardt B. (1998) Differentiation of blood-brain barrier endothelial cells. Pathol Biol (Paris); 46(3):171-5.

Rodarte C., Hood D.C., Yang E.B., Grippo T., Greenstein V.C., Liebmann J.M., Ritch R. (2006) The effects of glaucoma on the latency of the multifocal visual evoked potential. Br J Ophthalmol; 90(9):1132-6.

Rohen J.W., Lütjen-Drecoll E., Flügel C., Meyer M., Grierson I. (1993) Ultrastructure of the trabecular meshwork in untreated cases of primary open-angle glaucoma (POAG). *Exp Eye Res*; 56(6):683-92.

Roitt I.M., Brostoff J., Male D.K. (1991) Autoimmunität und Autoimmunerkrankungen. S.305-317. *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. Deutsche Übersetzung von Harabacz. 2.Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart.

Romano C., Li Z., Arendt A., Hargrave P.A., Wax M.B. (1999) Epitope mapping of antirhodopsin antibodies from patients with normal pressure glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 40:1275-1280.

Salvador-Silva M., Ricard C.S., Agapova O.A., Yang P., Hernandez M.R. (2001) Expression of small heat shock proteins and intermediate filaments in the human optic nerve head astrocytes exposed to elevated hydrostatic pressure in vitro. *J Neurosci Res*; 1; 66(1):59-73.

Sappington R.M., Calkins D.J. (2008) Contribution of TRPV1 to microglia-derived IL-6 and NFkappaB translocation with elevated hydrostatic pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 49:3004-17.

Sappington R.M., Sidorova T., Long D.J., Calkins D.J. (2008) TRPV1: Contribution to Retinal Ganglion Cell Apoptosis and Increased Intracellular Ca²⁺ with Exposure to Hydrostatic Pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 50(2):717-28.

Savagian C.A., Dubielzig R.R., Nork T.M. (2008) Comparison of the distribution of glial fibrillary acidic protein, heat shock protein 60, and hypoxia-inducible factor-1alpha in retinas from glaucomatous and normal canine eyes. *Am J Vet Res*; 69:265-272.

Schluesener H.J., Sobel R.A., Linington C., Weiner H.L. (1987) A monoclonal antibody against a myelin oligodendrocyte glycoprotein induces relapses and demyelination in central nervous system autoimmune disease. *J Immunol* 15; 139(12):4016-21.

Schmeisser E.T., Smith T.J. (1989) High-frequency flicker visual-evoked potential losses in glaucoma. *Ophthalmology*; 96:620-623.

Schmidt S., Haase C.G., Bezman L., Moser H., Schmidt M., Köhler W., Linington C., Klockgether T. (2001) Serum autoantibody responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein and myelin basic protein in X-linked adrenoleukodystrophy and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*; 3; 119(1):88-94.

Schneider C., Schuetz G., Zollner T.M. (2009) Acute neuroinflammation in Lewis rats - a model for acute multiple sclerosis relapses. *J Neuroimmunol*; 18; 213(1-2):84-90.

Schober W. (1975) The primary optical projection in albino and pigmented rats. *Anat Anz*; 137:257-286.

Schori H., Yoles E., Kipnis J., Schwartz M. (2001) Glutamat toxicity in the central nervous system is balanced by a beneficial T-cell-dependent autoimmune activity. *J Neuroimmunol*; 119:199-204.

Schuman J.S., Hee M.R., Arya A.V., Pedut-Kloizman T., Puliafito C.A., Fujimoto J.G., Swanson E.A. (1995) Optical coherence tomography: a new tool for glaucoma diagnosis. *Curr Opin Ophthalmol*; 6(2):89-95.

Schwartz M., Kipnis J. (2001) Genetic control of immune response to trauma: vaccination for acute and chronic CNS degenerative disorders. *Trends Mol Med*; 7:252-58.

Schwartz M. (2003) Neurodegeneration and neuroprotection in glaucoma: development of a therapeutic neuroprotective vaccine: the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 44:1407-1411.

Schwartz M. (2004) Vaccination for glaucoma: dream or reality? *Brain Res Bull*; 62:481-484.

Schwartz M. (2007) Modulating the immune system: a vaccine for glaucoma? *Can J Ophthalmol*; 42:439-441.

Shindler K.S., Ventura E., Dutt M., Rostami A. (2008) Inflammatory demyelination induces axonal injury and retinal ganglion cell apoptosis in experimental optic neuritis. *Exp Eye Res*; 87(3):208-13.

Singer H.S., Loiselle C.R., Lee O., Garvey M.A., Grus F.H. (2003) Anti-basal ganglia antibody abnormalities in Sydenham chorea. *Journal of Neuroimmunology*; 136:154-161.

Singer H.S., Loiselle C.R., Lee O., Minzer K., Swedo S., Grus F.H. (2004) Anti-basal ganglia antibodies in PANDAS. *Movement Disorders*; 19:406-416.

Sit A.J., Liu J.H. (2009) Pathophysiology of glaucoma and continuous measurements of intraocular pressure. *Mol Cell Biomech*; 6(1):57-69.

Sommer A., Tielsch J.M., Katz J., Quigley H.A., Gottsch J.D., Javitt J.J., Singh K. (1991) Relationship between intraocular pressure and primary open angle glaucoma among white and black Americans. The Baltimore Eye Survey. *Archives of Ophthalmology*; 109:1090-1095.

Spekreijse H., Apkarian P. (1986) The use of a system analysis approach to electrodiagnostic (ERG and VEP) assessment. *Vision Res*; 26:195-219.

Sternberg E.M., Hill J.M., Chrousos G.P., Kamilaris T., Listwak S.J., Gold P.W., Wilder R.L. (1989) Inflammatory mediator-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation is defective in streptococcal cell wall arthritis-susceptible Lewis rats. *Proc Natl Acad Sci USA*; 86:2374-8.

Stevens B., Allen N.J., Vazquez L.E., Howell G.R., Christopherson K.S., Nouri N., Micheva K.D., Mehalow A.K., Huberman A.D., Stafford B., Sher A., Litke A.M., Lambris J.D., Smith S.J., John S.W., Barres B.A. (2007). The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*; 131:1164-1178.

Stöhr M., Dichigans J., Buettner U.W., Hess C.W. (2005) Visuell evozierte Potentiale. S.1-16. Evozierte Potentiale SEP – VEP – AEP – EKP – MEP. 4. Auflage. Springer Verlag, Heidelberg.

- Streilein J.W. (1995a) Unraveling immune privilege. *Science*; 270:1158-1159.
- Streilein J.W. (1995b) Immunological non-responsiveness and acquisition of tolerance in relation to immune privilege in the eye. *Eye*; 9:236-240.
- Streilein J.W., Ksander B.R., Taylor A.W. (1997) Immune deviation in relation to ocular immune privilege. *Journal of Immunology*; 158:3557-3560.
- Streilein J.W. (1999) Immunoregulatory mechanisms of the eye. *Progress in Retinal and Eye Research*; 18:357-370.
- Sugiyama T., Utsunomiya K., Ota H., Ogura Y., Narabayashi I., Ikeda T. (2006) Comparative study of cerebral blood flow in patients with normal-tension glaucoma and control subjects. *Am J Ophthalmol*; 141(2):394-6.
- Tabira T. (1989) Cellular and molecular aspects of the pathomechanism and therapy of murine experimental allergic encephalomyelitis. *Crit Rev Neurobiol*; 5(2):113-42.
- Tetz M., Schwenn O. (2007) Glaukom. S.309–337. In: Augustin A.J. (Hrsg.) *Augenheilkunde*. 3.Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg und New York.
- Tezel G., Seigel G.M., Wax M.B. (1998) Autoantibodies to small heat shock proteins in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 39:2277–2287.
- Tezel G., Edward D.P., Wax M.B. (1999) Serum autoantibodies to optic nerve head glycosaminoglycans in patients with glaucoma. *Arch Ophthalmol*; 117:917–924.
- Tezel G., Hernandez R., Wax M.B. (2000) Immunostaining of heat shock proteins in the retina and optic nerve head of normal and glaucomatous eyes. *Arch Ophthalmol*; 118:511-518.
- Tezel G., Yang X., Yang J., Wax M.B. (2004) Role of tumor necrosis factor receptor-1 in the death of retinal ganglion cells following optic nerve crush injury in mice. *Brain Res*; 23; 996(2):202-12.
- Tezel G., Wax M.B. (2004) The immune system and glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol*; 15:80-84.
- Tezel G., Yang X., Cei J. (2005) Proteomic identification of oxidatively modified retinal proteins in a chronic pressure-induced rat model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 46(9):3177-87.
- Tezel G. (2006) Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: Mechanisms and consequences. *Prog Retin Eye Res*; 25(5):490-513.
- Tezel G.; Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference Working Group. (2009) The role of glia, mitochondria, and the immune system in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.; 50(3):1001-12.
- Thanos S., Naskar R. (2004) Correlation between retinal ganglion cell death and chronically developing inherited glaucoma in a new rat mutant. *Exp Eye Res*; 79(1):119-29.

- Tomassini V., De Giglio L., Reindl M., Russo P., Pestalozza I., Pantano P., Berger T., Pozzilli C. (2007) Anti-myelin antibodies predict the clinical outcome after a first episode suggestive of MS. *Mult Scler*; 13(9):1086-94.
- Tyler C.W. (1981) Specific deficits of flicker sensitivity in glaucoma and ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 20:204-212.
- van Velthoven M.E., Faber D.J., Verbraak F.D., van Leeuwen T.G., de Smet M.D. (2007) Recent developments in optical coherence tomography for imaging the retina. *Prog Retin Eye Res*; 26(1):57-77.
- Vecino E., Hernández M., García M. (2004) Cell death in the developing vertebrate retina. *Int J Dev Biol*; 48(8-9):965-74.
- Vedula S., Brodney-Folse S., Gal R., Beck R. (2007) Corticosteroids for treating optic neuritis. *Cochrane database of systematic reviews*; CD001430.
- Vincent A., McConville J., Farrugia M.E., Newsom-Davis J. (2004) Seronegative myasthenia gravis. *Semin Neurol*; 24:125–133.
- Viswanathan S., Frishman L.J., Robson J.G., Harwerth R.S., Smith E.L.3rd. (1999) The photopic negative response of the macaque electroretinogram: reduction by experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 40(6):1124-36.
- Viswanathan S., Frishman L.J., Robson J.G., Walters J.W. (2001) The photopic negative response of the flash electroretinogram in primary open angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 42(2):514-22.
- Vogel P. (2006) Visuell evozierte Potentiale. S.153-168. *Kursbuch klinische Neurophysiologie. EMG – ENG - Evozierte Potentiale. 2.Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart.*
- Vorwerk C.K., Gorla M.S., Dreyer E.B. (1999) An experimental basis for implicating excitotoxicity in glaucomatous optic neuropathy. *Surv Ophthalmol*; 43(1):142-150.
- Vojdani A., Vojdani E., Cooper E. (2003) Antibodies to myelin basic protein, myelin oligodendrocytes peptides, alpha-beta-crystallin, lymphocyte activation and cytokine production in patients with multiple sclerosis. *J Intern Med*; 254(4):363-74.
- Warren K.G., Catz I. (1994) Relative frequency of autoantibodies to myelin basic protein and proteolipid protein in optic neuritis and multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *J Neurol Sci*; 121(1):66-73.
- Wax M.B., Barrett D.A., Pestronk A. (1994) Increased incidence of paraproteinemia and autoantibodies in patients with normal pressure glaucoma. *Am J Ophthalmol*; 117:561–568.
- Wax M.B., Tezel G., Saito I., Gupta R.S., Harley J.B., Li Z., Romano C. (1998a) Anti-Ro/SS-A positivity and heat shock protein antibodies in patients with normal-pressure glaucoma. *Am J Ophthalmol*; 125(2):145-57.

Wax M.B., Tezel G., Edward P.D. (1998b) Clinical and ocular histopathological findings in a patient with normal-pressure glaucoma. *Arch Ophthalmol*; 116(8):993-1001.

Wax M.B. (2000) Is there a role for the immune system in glaucomatous optic neuropathy? *Curr Opin Ophthalmol*; 11:145–150.

Wax M.B., Yang J., Tezel G. (2001) Serum autoantibodies in patients with glaucoma. *J Glaucoma*; 10(5 Suppl 1):22-4.

Wax M.B., Tezel G. (2002) Neurobiology of glaucomatous optic neuropathy: diverse cellular events in neurodegeneration and neuroprotection. *Mol Neurobiol*; 26(1):45-55.

Wax M.B., Tezel G., Yang J., Peng G., Patil R.V., Agarwal N., Sappington R.M., Calkins D.J. (2008) Induced autoimmunity to heat shock proteins elicits glaucomatous loss of retinal ganglion cell neurons via activated T-cell-derived fas-ligand. *J Neurosci*; 28(46):12085-96.

Wendlandt J.T., Grus F.H., Hansen B.H., Singer H.S. (2001) Striatal antibodies in children with Tourette's syndrome: multivariate discriminant analysis of IgG repertoires. *Journal of Neuroimmunology*; 119:106-113.

Wildner G., Diedrichs-Mohring M., Thurau S.R. (2008) Rat models of autoimmune uveitis. *Ophthalmic Res*; 40(3-4):141-4.

Winer S., Astsaturov I., Cheung R.K., Schrade K., Gunaratnam L., Wood D.D., Moscarello M.A., O'Connor P., McKerlie C., Becker D.J., Dosch H.M. (2001) T cells of multiple sclerosis patients target a common environmental peptide that causes encephalitis in mice. *J Immunol*; 166(7):4751-6.

Wizenmann A., Thanos S., von Boxberg Y., Bonhoeffer F. (1993) Differential reaction of crossing and non-crossing rat retinal axons on cell membrane preparations from the chiasm midline: an in vitro study. *Development*; 117:725-735.

Wujek J., Bjartmar C., Richer E., Ransohoff R.M., Yu M., Tuhoy V.K., Trapp B.D. (2002) Axon loss in the spinal cord determines permanent neurological disability in an animal model of multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*; 61:23-32.

Xu H., Manivannan A., Jiang H.R., Liversidge J., Sharp P.F., Forrester J.V., Crane I.J. (2004) Recruitment of IFN-gamma-producing (Th1-like) cells into the inflamed retina in vivo is preferentially regulated by P-selectin glycoprotein ligand 1:P/E-selectin interactions. *J Immunol*; 172(5):3215-24.

Yan D.B., Coloma F.M., Metheetrairut A., Trope G.E., Heathcote J.G., Ethier C.R. (1994) Deformation of the lamina cribrosa by elevated intraocular pressure. *British Journal of Ophthalmology*; 78:643-648.

Yang J., Tezel G., Patil R.V., Romano C., Wax M.B. (2001a) Serum autoantibody against glutathione S-transferase in patients with glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 42:1273–1276.

Yang J., Patil R.V., Yu H., Gordon M., Wax M.B. (2001b) T cell subsets and sIL-2R/IL-2 levels in patients with glaucoma. *Am J Ophthalmol*; 131:421–426.

Yoles E., Muller S., Schwartz M. (1997) NMDA-receptor antagonist protects neurons from secondary degeneration after partial optic nerve crush. *J Neurotrauma*; 14(9):665-75.

Zargari M., Allameh A., Sanati M.H., Tiraihi T., Lavasani S., Emadyan O. (2007) Relationship between the clinical scoring and demyelination in central nervous system with total antioxidant capacity of plasma during experimental autoimmune encephalomyelitis development in mice. *Neurosci Lett*; 412(1):24-8.

Zimmermann C.W., Weiss G. (1987) Antibodies not directed against the acetylcholine receptor in myasthenia gravis. An immunoblot study. *J Neuroimmunol*; 16:225–236.

Zimmermann C.W., Eblen F., Herzau V., Reinauer K.M. (1989) The diagnostic value of serum autoantibodies in endocrine orbitopathy and idiopathic ocular myositis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*; 27(6):521-5.

Elektronische Daten:

Bach M., Computersystem EP2000:
<http://www.michaelbach.de/ep2000/index.html>
(Stand 12.11.2009)

9. Anhang

Übersicht zur Auswertung des Augeninnendruckverlaufs während der Studie zum Experimentellen Autoimmunen Glaukom mit Tukey's HSD. Es lagen keine signifikanten Abweichungen vor.

	GFAP AP	GFAP 2W	GFAP 4W	MBP AP	MBP 2W	MBP 4W	SN AP	SN 2W	SN 4W	KO AP	KO 2W	KO 4W
GFAP AP		0.995613	0.887221	1.000000	0.962121	0.755664	1.000000	0.962121	0.631189	1.000000	0.800334	0.999989
GFAP 2W	0.995613		0.999989	0.999956	1.000000	0.999606	0.985471	1.000000	0.996790	0.966588	0.999917	0.999998
GFAP 4W	0.887221	0.999989		0.985471	1.000000	1.000000	0.805442	1.000000	0.999999	0.699829	1.000000	0.995613
MBP AP	1.000000	0.999956	0.985471		0.997842	0.943202	0.999989	0.997842	0.875429	0.999932	0.963943	1.000000
MBP 2W	0.962121	1.000000	1.000000	0.997842		0.999998	0.918402	1.000000	0.999904	0.853990	1.000000	0.999606
MBP 4W	0.755664	0.999606	1.000000	0.943202	0.999998		0.643017	0.999998	1.000000	0.512358	1.000000	0.975910
SN AP	1.000000	0.985471	0.805442	0.999989	0.918402	0.643017		0.918402	0.513029	1.000000	0.689919	0.999858
SN 2W	0.962121	1.000000	1.000000	0.997842	1.000000	0.999998	0.918402		0.999904	0.853990	1.000000	0.999606
SN 4W	0.631189	0.996790	0.999999	0.875429	0.999904	1.000000	0.513029	0.999904		0.3866631	1.000000	0.934382
KO AP	1.000000	0.966588	0.699829	0.999932	0.853990	0.512358	1.000000	0.853990	0.3866631		0.553930	0.999403
KO 2W	0.800334	0.999917	1.000000	0.963943	1.000000	1.000000	0.689919	1.000000	1.000000	0.553930		0.986983
KO 4W	0.999989	0.999998	0.995613	1.000000	0.999606	0.975910	0.999858	0.999606	0.934382	0.999403	0.986983	

Gruppen: GFAP = Glia fibrilläres saures Protein

MBP = Myelin basisches Protein

SN = Sehnerv

KO = Kontrolle

Zeitpunkte: AP = Ausgangszeitpunkt

2W = zwei Wochen nach Immunisierung

4W = vier Wochen nach Immunisierung