

Aus der Klinik für Neurologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

# **Etablierung und Charakterisierung eines neuen organotypischen Retina-Kulturmodells der adulten Ratte**

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

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von  
Stefan Rzeczinski  
aus Wriezen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. U. Dirnagl  
2. Prof. Dr. med. U. Pleyer  
3. Prof. Dr. med. M. Bähr

Datum der Promotion: 15.01.2007

## Zusammenfassung

Erstmals beschreiben wir eine für Neuroprotektions-Studien geeignete Methode der organotypischen Retina-Kultivierung der adulten Ratte. Die Netzhaut wurde in quadratische Fragmente mit einer Seitenlänge von 1 mm geschnitten und auf einer Wälzvorrichtung (60 Umdrehungen pro min) bis zu 90 Tage (*days in vitro*, DIV) bei 36,5°C kultiviert. Während der ersten Kultivierungstage veränderten die ursprünglich flachen Retinafragmente ihre Konfiguration. Nach 7 DIV waren die Retinakörper kugelförmig und bestanden aus den für die adulte Netzhaut typischen Schichten, wobei sich die äußere Körnerschicht außen und die Ganglienzellschicht (GCL) im Inneren befanden. Gliazellen, aussprossende Nervenzellfortsätze der axotomisierten Ganglienzellen sowie vaskuläre Strukturen wurden in den Retinakörpern nachgewiesen. Für 7 DIV kultivierte Retinakörper wurde ein Modell der Glutamat-induzierten Schädigung der GCL etabliert. Koapplikation des  $\beta$ -Carbolins Abecarnil zeigte keinen protektiven Effekt. Vorbehandlung mit 100 nM Simvastatin schützte vor Zelltod in der GCL. Somit konnte die Anwendbarkeit dieser Methode der organotypischen Kultivierung der adulten Retina als Modell retinaler bzw. neurodegenerativer Erkrankungen, wie z.B. dem Glaukom, demonstriert werden.

**Schlagwörter:** organotypische Retina-Kultivierung, adulte Ratte, Ganglienzellschicht, Glutamat, Abecarnil, Simvastatin

## Abstract

For the first time we describe an experimental *in vitro* system of organotypic retinal cultures of adult rat, which is applicable to neuroprotection studies. Retinas were cut into square slices of approximately 1 mm<sup>2</sup>. Up to 90 days *in vitro* (DIV), free-floating slices were cultured on a horizontal rotating roller drum (60 rpm) in an incubator at 36.5°C. During the first days of cultivation, primary flat retinal slices changed their configuration. After 7 DIV they have transformed into ball-shaped tissue-spheres (retinal bodies), which were formed by cell and fibre layers typical for mature retina with outer nuclear layer located on the outside and ganglion cell layer (GCL) located on the inside. Glial cells, sprouting nerve fibres of the axotomized ganglion cells, and vascular structures were shown. For 7 DIV, this culture system was further developed into a robust model of glutamate-induced neurotoxicity of GCL. No protective effect was observed when the  $\beta$ -carboline abecarnil was co-applied. Pre-treatment with 100 nM simvastatin reduced cell death in GCL. As we have demonstrated, this new system of adult organotypic retinal cultures can be applied for studies of glaucoma or other neurodegenerative disorders.

**Keywords:** organotypic retinal cultures, adult rat, ganglion cell layer, glutamate, abecarnil, simvastatin

**Meiner Tochter  
Frida Magdalena**

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>9</b>
1.1	Aufbau der Retina.....	9
1.2	Literaturübersicht über Kulturmodelle der Retina.....	12
1.3	Das Glaukom: Glutamat-Exzitotoxizität retinaler Ganglienzellen.....	14
1.4	Abecarnil, ein GABA-Modulator mit anti-exzitotoxischen Eigenschaften.....	15
1.5	Statine als neuroprotektive Substanzen.....	17
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	18
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>19</b>
2.1	Präparation und Kultivierung der Netzhaut.....	19
2.2	Pharmakologische Interventionen.....	22
2.2.1	Verabreichung von Glutamat, MK-801, Abecarnil.....	22
2.2.2	Verabreichung von Simvastatin.....	24
2.3	Aufarbeitung der Retinakörper.....	25
2.3.1	Fixation und Dehydratation.....	25
2.3.2	Herstellung von Paraffinschnitten.....	25
2.4	Histologische Färbungen.....	26
2.4.1	Hämatoxylin-Eosin-Nissl-Färbung.....	26
2.4.2	Silberimprägnation.....	27
2.5	Immunzytochemische Färbungen.....	28
2.5.1	Auswahl der Zellmarker.....	28
2.5.2	Färbungen mittels TUNEL und Zellmarker.....	29
2.6	Schadensevaluation.....	30
2.6.1	Schadensevaluation der Hämatoxylin-Eosin-Nissl-Färbung.....	30
2.6.2	Schadensevaluation der TUNEL-DAPI-Färbung.....	31
2.7	Angewandte statistische Verfahren.....	32

2.8	Materialien.....	32
2.8.1	Zellkulturmedien.....	32
2.8.2	Antikörper.....	32
2.8.3	Chemikalien.....	33
2.8.4	Geräte.....	34
2.8.5	Sonstige Materialien.....	34
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>35</b>
3.1	Etablierung eines organotypischen Retina-Kulturmodells der adulten Ratte...	35
3.1.1	Die kultivierten Retinafragmente sind organotypisch aufgebaut.....	35
3.1.2	Nachweis von Nerven- und Gliafasern in den Retinakörpern.....	37
3.1.3	Nachweis vaskulärer Strukturen in den Retinakörpern.....	38
3.2	Anwendungen des Modells: Untersuchungen zur Neuroprotektion.....	39
3.2.1	Modell der exzitotoxischen Schädigung der Ganglienzellschicht (GCL).....	39
3.2.2	Abecarnil schützt nicht vor Glutamat-induzierter Schädigung der GCL.....	42
3.2.3	Simvastatin schützt vor Glutamat-induziertem Zelltod in der GCL.....	45
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>48</b>
4.1	Besonderheiten im Vergleich zu anderen Kulturmodellen der Retina.....	49
4.2	Studien zur Neuroprotektion: Abecarnil.....	52
4.3	Studien zur Neuroprotektion: Simvastatin.....	54
4.4	Ausblick.....	56
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>57</b>

<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>58</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>70</b>
I	Abkürzungsverzeichnis.....	70
II	Danksagung.....	72
III	Eigene Publikationen.....	73
IV	Lebenslauf.....	74
V	Eidesstattliche Erklärung.....	75