

2. MATERIAL UND METHODEN

Im Folgenden werden die angewandten Methoden erläutert. Die Präparation und Kultivierung der adulten Netzhaut werden beschrieben. Es folgen die Protokolle der pharmakologischen Interventionen, der Aufarbeitung der Retinakörper, sowie der histologischen und immunzytochemischen Färbungen. Die Quantifizierung des induzierten Schadens wird beschrieben. Schließlich folgen Angaben zur angewandten Statistik sowie zur Herkunft der Materialien.

2.1 Präparation und Kultivierung der Netzhaut

Männliche adulte Wistar-Ratten (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin) mit einem Körpergewicht von 220-240 g wurden in tiefe Isofluran-Narkose versetzt und dekapitiert. Die Köpfe wurden sofort mit 70 % Ethanol desinfiziert und in sterilem destilliertem Wasser gewaschen.

Alle weiteren Präparationschritte wurden unter sterilen Bedingungen an der Sterilwerkbank durchgeführt. Die Augen wurden entnommen und in eine Gewebekulturschale mit 8 g/l angereicherte phosphatgepufferte Kochsalzlösung ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (*phosphate buffered solution*, PBS) überführt. An der Grenze zwischen Kornea und Sklera wurde unter einer binokulären Optik bei 10-facher Vergrößerung mit einer Skalpellklinge Größe 11 eine Inzision gesetzt und mit einer Mikroschere entlang der Ora serrata geschnitten. Kornea, Linse und Glaskörper wurde entfernt. Mithilfe von Pinzetten mit langen, fein gebogenen Spitzen wurde die gesamte Netzhaut von Sklera und retinalem Pigmentepithel getrennt und in eine mit Nährmedium (s. unten) gefüllte Gewebekulturschale überführt. Nun wurde die Retina flach ausgebreitet und mit einer Skalpellklinge Größe 10 in quadratische Fragmente mit einer Seitenlänge von 1 mm geschnitten. Die Netzhautfragmente der Augen von 4 Ratten wurden zusammen mit 12 ml Nährmedium überführt in eine 50 ml Laborflasche mit Schraubverschluss-Kappe. Diese wurde auf einer Wälzvorrichtung (60 Umdrehungen pro min) in einem Inkubator (36,5°C) platziert (Abbildung 2).

An jedem dritten Tag wurde jeweils ein Drittel des Nährmediums verworfen und durch frisches ersetzt.

Nährmedium: Minimum Essential Medium mit 10 % fötalem Kälberserum, 2 % B27-Supplement, 25 mM HEPES, 0,8 % D-Glukose, 2 mM L-Glutamin, 100 IE Penicillin und Streptomycin / ml.

Die bei der organotypischen Kultivierung der postnatalen Retina (Victorov *et al.*, 2004) verwendete Zusammensetzung des Nährmediums wurde wie folgt modifiziert: Der Anteil an fötalem Kälberserum beträgt hier 10 % statt 5 %. Humanes Plazentaserum sowie Insulin werden hier nicht verwendet.

Im Vergleich zur Präparation der postnatalen Retina (Victorov *et al.*, 2004) sind Maßnahmen der Desinfektion sowie das Einhalten steriler Bedingungen bei der Präparation der adulten Retina besonders wichtig. Für diesen Unterschied bezüglich der Gefahr der Kontaminierung der Retinakulturen dürfte die Tatsache eine Rolle spielen, dass die neonatale bzw. postnatale Ratte die Augen noch nicht öffnen kann.



Abbildung 2: Unsere Konstruktion einer Wälzvorrichtung für die organotypische Kultivierung der adulten Retina (modifiziert nach Victorov et al., 2001). Die Laborflaschen drehen sich mit konstanter Geschwindigkeit von 60 Umdrehungen pro min, so dass die Retinafragmente im Nährmedium flottieren. Die Wälzvorrichtung befindet sich bei Gebrauch in einem Inkubator (36,5°C).

2.2 Pharmakologische Interventionen

2.2.1 Verabreichung von Glutamat, MK-801, Abecarnil

Glutamat und der NMDA-Rezeptor-Antagonist MK-801 (Wong *et al.*, 1986) wurden als 500 mM bzw. 10 mM Stammlösung jeweils in PBS hergestellt. Abecarnil, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Mann Pharma, Berlin, wurde als 1 mM Stammlösung in Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt und mit PBS verdünnt. Das Vehikel wurde jeweils in gleicher Weise verdünnt und mit der höchsten Konzentration dem Medium zugegeben. In allen Experimenten hatten die reinen Lösungsmittel keinen Einfluß auf die Ergebnisse. Zur Untersuchung der Wirkung von Glutamat wurden Endkonzentrationen im Nährmedium von bis zu 10 mM gewählt. Zur Untersuchung der Wirkung von Abecarnil wurden Endkonzentrationen von 5 mM Glutamat sowie 10 µM MK-801 bzw. 1 nM bis 10 µM Abecarnil verabreicht. Vor Behandlung mit Abecarnil wurde DMSO (Dimethylsulfoxid; Konzentration maximal 0,1 %) zum Nährmedium hinzugegeben.

Für die pharmakologischen Untersuchungen an den organotypischen Retinakulturen wurden die Retinakörper nach 6 Kultivierungstagen (*days in vitro*, DIV) auf 25 ml Laborflaschen mit je 3 ml Nährmedium verteilt, so dass jeweils 12 Retinakörper eine Behandlungsgruppe bildeten (Abbildung 3). Nach Zugabe der pharmakologischen Substanzen wurden die Flaschen für weitere 24 h auf der Wälzvorrichtung kultiviert.

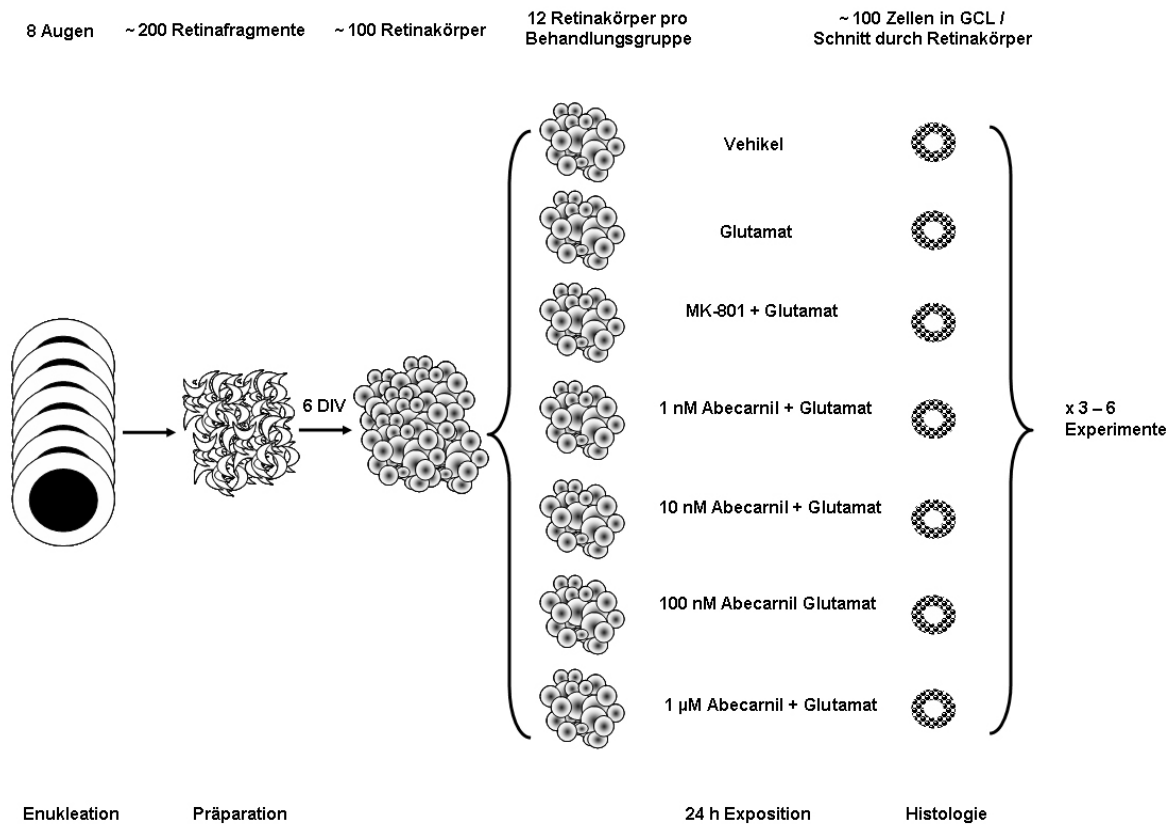


Abbildung 3: Schematische Darstellung der pharmakologischen Untersuchungen an den organotypischen Retinakulturen für das Beispiel der Versuchsreihe mit Abecarnil (s. Abschnitt 3.2.2). Die Retina wurde aus dem Auge herauspräpariert und in quadratische Fragmente mit einer Seitenlänge von 1 mm geschnitten. Alle Netzhautfragmente wurden zusammen in einer rotierenden 50 ml Laborflasche kultiviert. Nach 6 Kultivierungstagen (days in vitro, DIV) wurden je 12 Retinakörper einer 25 ml Laborflasche zugeordnet und die pharmakologischen Substanzen in jeweils 3 ml Nährmedium appliziert. 24 h später wurden die Retinakörper fixiert und histologisch aufgearbeitet. Auf jedem der gefärbten Retinakörper wurden die pro Schnitt etwa 100 Zellen der Ganglienzellschicht (GCL) evaluiert. Für jede der Behandlungsgruppen wurde dieses Experiment drei- bis sechsmal durchgeführt.

2.2.2 Verabreichung von Simvastatin

Simvastatin wurde durch alkalische Hydrolyse chemisch aktiviert (Gerson *et al.*, 1989), als 10 mM Stammlösung in PBS hergestellt und mit PBS verdünnt. Die Retinakörper wurden nach 3 DIV auf 25 ml Laborflaschen mit je 3 ml Nährmedium verteilt, so dass jeweils 12 Retinakörper eine Behandlungsgruppe bildeten. Simvastatin wurde am 3., Glutamat am 6. DIV appliziert. 24 h nach Verabreichung des Glutamat wurden die Retinakörper fixiert.

2.3 Aufarbeitung der Retinakörper

Unbehandelte Kulturen wurden nach verschiedenen Kultivierungszeiten, behandelte Kulturen dagegen nach 7 DIV (24 h nach Verabreichung von Glutamat), bei 20 °C fixiert und dehydriert, anschließend in Paraffin eingebettet, geschnitten, auf Objektträger gebracht und getrocknet.

2.3.1 Fixation und Dehydratation

1. Aspirieren der Retinakörper einer Behandlungsgruppe mittels Pipette und waschen in PBS
2. Fixation in modifiziertem Tellzesnicky Fixativ (96 %iges Ethanol 70 %; 39 %iges Formaldehyd 20 %; Essigsäure 10 %) für 10 min
3. Waschen in 2-Propanol 70 % für 10 min.
1 % Eosinlösung wurde hinzugegeben zur Erleichterung der Orientierung der Retinakörper im geschmolzenen Paraffin (s. Abschnitt 2.3.2)
4. Dehydratation in 2-Propanol 90 % für 30 min
5. Dreimalige Dehydratation in 2-Propanol 99,9 % für jeweils 30 min

2.3.2 Herstellung von Paraffinschnitten

Bei 60°C wurden die fixierten und dehydrierten Retinakörper für 2 h in geschmolzenes Paraffin in eine Einbettform gegeben. Anschließend wurden die Retinakörper für 1 h in frischem Paraffin eingebettet und danach in einer Ebene orientiert. Über Nacht erfolgte die Abkühlung des Paraffinblocks bei 20°C. Mit dem Mikrotom wurden 8 µM dicke Serienschnitte angefertigt, welche auf gelatinebeschichtete Objektträger gebracht wurden und über Nacht trockneten. Diese Schnitte konnten sowohl für die histologischen als auch für die immunzytochemischen Färbungen verwendet werden.

2.4 Histologische Färbungen

2.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Nissl-Färbung

1. Entfernung des Paraffins in Rotihistol
2. Rehydratation in der absteigenden 2-Propanol-Reihe (100 %, 96 %, 80 %, 70 %)
3. Waschen in destilliertem Wasser
4. Färben mit Gill N1 Hämatoxylin für 5 min
5. Waschen in destilliertem Wasser
6. Bläuen in 1 % Natriumhydrogencarbonat für 3 min
7. Waschen in destilliertem Wasser
8. Färben mit Kresylviolett (0,2 % Kresylviolett in 0,1 M Acetatpuffer; pH-Wert 3,5) für 30 Sekunden
9. Waschen in destilliertem Wasser
10. Färben mit Eosin für 30 Sekunden
11. Waschen in destilliertem Wasser
12. Dehydratation in aufsteigender Ethanolreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 %)
13. Fixierung in Rotihistol für 3 min
14. Eindeckeln der Schnitte mit dem Einschlussmittel Vitro-Clud

2.4.2 Silberimprägation

Zur Darstellung der Zytoarchitektur, insbesondere der Nervenzellfortsätze, wurden die Neurofibrillen mit Hilfe einer Silberimprägation nach Vogel gefärbt (Vogel *et al.*, 1999):

1. Entfernung des Paraffins in Rotihistol
2. Silberimprägnierungslösung (s. unten) für 2 min
3. Waschen in destilliertem Wasser für 6 min
4. Entwicklerlösung (s. unten) für 3 min
5. Waschen in destilliertem Wasser für 3 min
6. Fixierung in Rotihistol für 3 min
7. Eindeckeln der Schnitte mit dem Einschlussmittel Vitro-Clud

Silberimprägnierungslösung:

1. 10 ml gesättigte Lithiumcarbonatlösung (0,6 g in 50 ml Wasser) zu 5 ml 10 %-iger Silbernitratlösung geben
2. 500 µl 28 %-ige Ammoniaklösung hinzugeben
3. Auffüllen mit 75 ml destilliertem Wasser
4. Lösung unter Lichtverschluss halten

Entwicklerlösung:

1. 20 ml 37 %-ige Formaldehydlösung zu 70 ml destilliertem Wasser geben
2. 0,3 g Hydrochinon und 15 ml Aceton hinzufügen; leicht schütteln
3. 1,1 g Zitronensäure Trinatrium Dihydrat hinzugeben
4. Lösung bei 20°C für 1 h stehen lassen

2.5 Immunzytochemische Färbungen

2.5.1 Auswahl der Zellmarker

Die immunzytochemischen Färbungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. med. G. Kronenberg durchgeführt.

Färbung gegen das Mikrotubuli-assoziierte Protein, MAP2, welches als Bestandteil des Cytoskeletons in Perikarya und Dendriten intakter Neurone exprimiert wird (Bernhardt und Matus, 1984; Caceres *et al.*, 1984; Garner *et al.*, 1988), führten wir zur spezifischen Darstellung der Dendriten durch.

Färbung gegen das saure Gliafaserprotein, GFAP, welches in der Retina in Astrozyten (Bignami und Dahl, 1977; Kumpulainen *et al.*, 1983; Schnitzer, 1988) sowie in Müller-Stützzellen (Guerin *et al.*, 1990) lokalisiert ist, wendeten wir zur Darstellung der glialen Struktur unserer Retinakulturen an.

Zur Darstellung vaskulärer Strukturen färbten wir gegen von-Willebrand-Faktor, welcher in aktivierten Endothelzellen exprimiert wird (Gralnick und Coller, 1975).

Die sehr sensitive TUNEL-Färbung (Terminale-Desoxynukleotidyl-Transferase-vermitteltes dUTP-Biotin „nick end labeling“), welche DNA-Strangbrüche darstellt, die durch Endonukleaseaktivität in apoptotischen Zellen entstehen (Gavrieli *et al.*, 1992), führten wir zur Identifizierung geschädigter Zellen der GCL in einem Schadensmodell durch.

DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol) ist ein fluoreszierender, interkalierender DNA-Farbstoff (Kapuscinski und Skoczylas, 1978). Die DAPI-Färbung, welche sämtliche Zellkerne anfärbt, führten wir in Kombination mit der TUNEL-Färbung durch, um die Anzahl geschädigter Zellkerne ins Verhältnis zur Gesamtzahl der Zellkerne in der GCL zu setzen.

2.5.2 Färbungen mittels TUNEL und Zellmarker

1. Entfernung des Paraffins in NeoClear
2. Rehydratation in der absteigenden Ethanolreihe (100 %, 96 %, 70 %)
3. Zweimaliges Waschen in Tris-gepufferter Salzlösung (TBS)
4. TBS-plus (100 ml: 96 ml TBS; 1 ml Triton X-100 10 %; 3 ml Eselserum) für 30 min
5. Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C:

primärer Antikörper	Typ	Spezies	Titer	sekundärer Antikörper
anti-MAP2	polyklonal	Kaninchen	1:250	biotinylierter anti-Kaninchen-IgG (hergestellt im Esel)
anti-GFAP	polyklonal	Meerschweinchen	1:1000	biotinylierter anti-Meerschweinchen-IgG (hergestellt im Esel)
anti-von-Willebrand-Faktor	polyklonal	Kaninchen	1:250	biotinylierter anti-Kaninchen-IgG (hergestellt im Esel)

6. Zweimaliges Waschen in TBS
7. TBS-plus für 30 min
8. Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:125) für 1 h bei 20 °C
9. Sechsmaliges Waschen in TBS
10. Nur für TUNEL-Färbung: Durchführung nach dem Protokoll des Herstellers
11. Zweimaliges Waschen in TBS
12. Eindeckeln der Schnitte mit dem Einschlussmittel ImmunoFluor
13. Lagerung bei Dunkelheit, 4 °C

2.6 Schadensevaluation

Von den gefärbten Serienschnitten einer Behandlungsgruppe wurde ein Schnitt ausgewählt, der die 12 Retinakörper jeweils etwa in ihrer Mitte zeigt, wodurch möglichst viele Zellen der GCL beurteilt wurden. Diese derart angeschnittenen 12 Retinakörper wurden jeweils digital photographiert; eine Bildbearbeitung im Sinne einer Kontrast- oder Intensitätsverstärkung fand nicht statt.

2.6.1 Schadensevaluation der Hämatoxylin-Eosin-Nissl-Färbung

Unter einem binokulären Mikroskop wurden bei 400facher Vergrößerung die Schnitte durch die 12 Retinakörper digital photographiert. Ungeschädigte und geschädigte Zellen der GCL wurden aufgrund morphologischer Kriterien unterschieden und von einem bezüglich der Behandlungsgruppen verblindeten Beobachter gezählt. Zellen der GCL wurden als geschädigt klassifiziert, wenn mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllt war: Schwellung, Schrumpfung (Pyknosis), oder Fragmentierung des Zellkerns (Abbildung 4). Zwischen den beiden prinzipiellen Formen des neuronalen Zelltods, Apoptose und Nekrose, wurde hierbei nicht differenziert. Als Maß für die Schädigung wurde das Verhältnis geschädigter Zellen zur Gesamtzellzahl der GCL verwendet. Der Mittelwert aus den Schadensquotienten der 12 Retinakörper wurde gebildet.

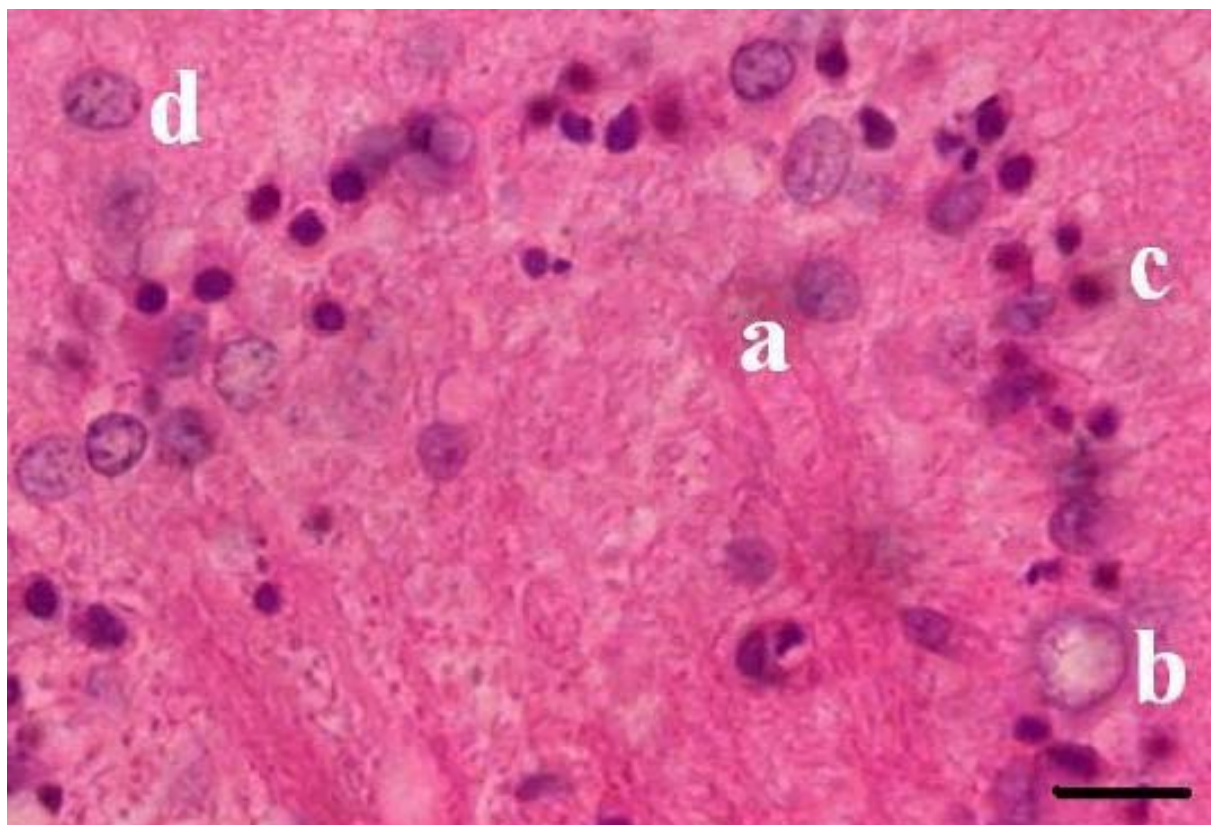


Abbildung 4: Darstellung geschädigter Zellen der Ganglienzellschicht (GCL).

(a) zeigt eine ungeschädigte Zelle. Geschwollene (b), pyknotische (c) oder fragmentierte (d) Zellkerne wurden als geschädigt klassifiziert. Alle der etwa 100 Zellen der GCL eines Anschnittes wurde evaluiert; zwischen Apoptose und Nekrose wurde nicht differenziert. Hämatoxylin-Eosin-Nissl-Färbung. Der Skalierungsbalken entspricht 20 μm .

2.6.2 Schadensevaluation der TUNEL-DAPI-Färbung

Unter einem Fluoreszenzmikroskop wurden bei 400facher Vergrößerung die Schnitte durch die 12 Retinakörper digital photographiert. Die Zellen wurden als TUNEL-positiv klassifiziert, wenn sie ein deutliches nukleäres Signal mit kondensierten Nuklei ohne zytoplasmatische Anfärbung aufwiesen, und von einem bezüglich der Behandlungsgruppen verblindeten Beobachter gezählt. Als Maß für die Schädigung wurde das Verhältnis TUNEL-positiver Zellen zur Anzahl DAPI-gefärbter Zellen der GCL verwendet. Der Mittelwert aus den Schadensquotienten der 12 Retinakörper wurde gebildet.

2.7 Angewandte statistische Verfahren

Pro Experiment wurden aus jeder Behandlungsgruppe die (etwa 100) angeschnittenen Zellen der GCL eines jeden der 12 Retinakörper beurteilt. Die Daten aus 3-6 unabhängigen Experimenten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Zur statistischen Analyse wurde eine Varianzanalyse (ANOVA, one-way analysis of variance) angewandt. Wenn signifikant, so wurden Vergleiche zwischen den Gruppen mittels ungepaartem t-Test mit der Bonferroni-Angleichung als posthoc-Test durchgeführt. Hierzu wurde das Programm Statview verwendet; ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant erachtet. Die Fehlerbalken in den Abbildungen stellen die jeweilige Standardabweichung dar.

2.8 Materialien

2.8.1 Zellkulturmedien

B27-Supplement	Life Technologies, Karlsruhe
Kälberserum, fötales	Biochrom, Berlin
Minimum Essential Medium	Biochrom, Berlin
<i>Phosphate buffered saline</i> ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}	Life Technologies, Karlsruhe

2.8.2 Antikörper

anti-GFAP	AdvancedImmunoChem, Long Beach, CA
anti-Kaninchen-IgG	JacksonImmunoResearch, West Grove, PA
anti-MAP2	Chemicon International, Hofheim
anti-Meerschweinchen-IgG	JacksonImmunoResearch, West Grove, PA

anti-von-Willebrand-Faktor	Abcam, Cambridge, UK
biotinylierter anti-Kaninchen-IgG (hergestellt im Esel)	Dianova, Hamburg
biotinylierter anti-Meerschweinchen-IgG (hergestellt im Esel)	Dianova, Hamburg
Eselserum	Dianova, Hamburg
TUNEL-Kit (In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein)	Roche Applied Science, Mannheim

2.8.3 Chemikalien

Abecarnil	Dr. Mann Pharma, Berlin
Ammoniak	Sigma-Aldrich, Steinheim
CNQX	Sigma, Deisenhofen
DAPI (4,6-Diaminidino-2-Phenylindol)	Molecular Probes, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Eosin Y 1 %	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Gill N1 Hämatoxylin	Sigma, Deisenhofen
D-Glukose	Sigma, Deisenhofen
Glutamat	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
HEPES	Biochrom, Berlin
Hydrochinon	Sigma, Deisenhofen
ImmunoFluor (Einschlussmittel)	ICN, Eschwege
Isofluran	Hoechst AG, Frankfurt/Main
Kresylviolett-Acetat	Sigma, Deisenhofen
Lithiumcarbonat	Sigma, Deisenhofen
MK-801	Research Biochemicals International, Natick, MA, USA
Natriumhydrogencarbonat	Sigma, Deisenhofen

NeoClear	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
2-Propanol	Sigma, Deisenhofen
Rotihistol	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Sigma, Deisenhofen
Simvastatin	Gödecke AG, Freiburg
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Vitro-Clud (Einschlussmittel)	R. Langenbrick GmbH, Emmendingen
Zitronensäure Trinatrium Dihydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.8.4 Geräte

Digitalkamera	Eclipse E2000, Nikon, Japan
Fluoreszenzmikroskop	Leica, Heerbrueg, Schweiz
Inkubator	Bio-Rad Laboratories, München
Lichtmikroskop (Histologie)	Nikon, Japan
Lichtmikroskop (Präparation)	Leica Zoom 2000, Leitz, Wetzlar
Sterilwerkbank	Nuaire, Plymouth, MM, USA
Wälzvorrichtung	Medizinisch-technische Labore der Charité - Universitätsmedizin Berlin

2.8.5 Sonstige Materialien

Paraffin-Einbettform	Electron Microscopical Science, München
Gewebekulturschalen 25 cm ²	Falcon, Heidelberg
Laborflaschen, 25 ml und 50 ml	VWR International GmbH, Darmstadt
Paraffin	Paraplast Plus, Sigma, Deisenhofen
Pinzetten	Electron Microscopical Science, München