

3. ERGEBNISSE

Im Folgenden werden die kultivierten Fragmente der adulten Netzhaut als kugelförmige Retinakörper mit organotypischem Aufbau beschrieben. In den Retinakörpern werden Nerven- und Gliafasern sowie vaskuläre Strukturen nachgewiesen. Anschließend werden Anwendungen des organotypischen Kulturmodells demonstriert.

3.1 Etablierung eines organotypischen Retina-Kulturmodells der adulten Ratte

3.1.1 Die kultivierten Retinafragmente sind organotypisch aufgebaut

Die kultivierten Fragmente der adulten Retina wurden nach verschiedenen Zeitpunkten fixiert und morphologisch analysiert. Wie aus Abbildung 5 ersichtlich, veränderten die ursprünglich flachen Retinafragmente (Abbildung 5 A) ihre Konfiguration während der ersten Kultivierungstage (Abbildung 5 B). Es entstanden kugelförmige Retinakörper (Abbildung 5 C), welche sämtliche für eine adulte Retina typischen Schichten enthielten, wobei sich die ONL außen und die GCL im Inneren befanden. Die Färbung der aufeinanderfolgenden benachbarten Schnitte eines Retinakörpers führte zur Darstellung des dreidimensionalen Aufbaus. Auch nach bis zu 90 DIV findet sich eine kugelförmige Struktur mit den für die Retina typischen Schichten (Abbildung 5 D bis F). Allerdings erscheinen nach 90 DIV die ONL degeneriert und die INL aufgelockert; die GCL dagegen ist relativ gut erhalten (Abbildung 5 F).

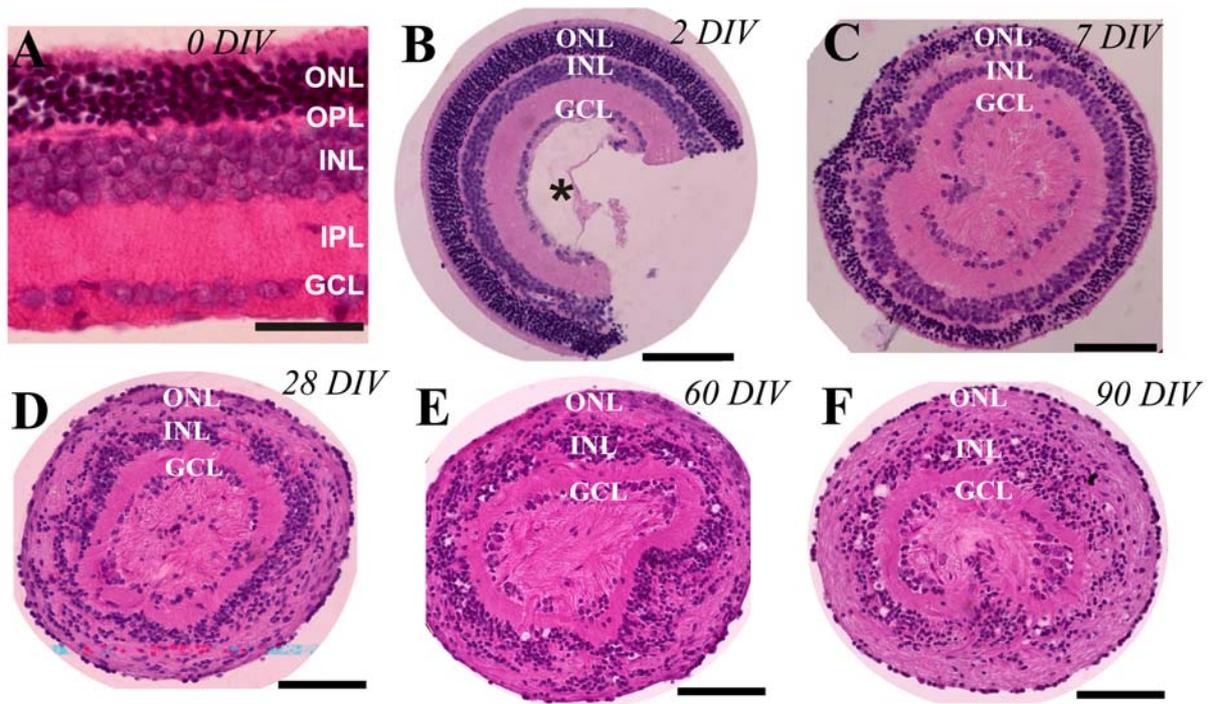


Abbildung 5: Struktur der Retinakörper nach verschiedenen Kultivierungszeiten.

A: Native Retina. Die verschiedenen Schichten der Retina können deutlich voneinander unterschieden werden. ONL – äußere Körnerschicht; OPL – äußere plexiforme Schicht; INL – innere Körnerschicht; IPL – innere plexiforme Schicht; GCL – Ganglienzellschicht.

B: Nach 2 Kultivierungstagen (days in vitro, DIV) besitzen die Retinakörper alle für eine Retina typischen Zell- und Faserschichten; zentral findet sich eine Kavität (*).

C: Nach 7 DIV ist der kugelförmige Retinakörper komplett ausgefüllt; die Schichten sind gut erhalten.

D-F: Nach 28, 60, 90 DIV liegt noch immer eine kugelförmige Struktur vor mit den für die Retina typischen Schichten. Während die ONL degeneriert und die INL aufgelockert erscheinen, ist die GCL relativ gut erhalten.

A-F: Hämatoxylin-Eosin-Nissl-Färbung.

Der Skalierungsbalken entspricht einer Länge von **A:** 50 μm bzw. **B-F:** 100 μm .

3.1.2 Nachweis von Nerven- und Gliafasern in den Retinakörpern

Durch immunzytochemische Färbung gegen das Mikrotubuli-assoziierte Protein (MAP2) wurden die Perikarya und Dendriten intakter Neurone dargestellt. Wie aus Abbildungen 6 A und B ersichtlich, finden sich aussprossende Nervenfasern der Ganglienzellen im zentralen Kern der Retinakörper, wo sie ein dichtes Geflecht bilden.

Durch immunzytochemische Färbung gegen das saure Gliafaserprotein (GFAP) wurden Astrozyten sowie Müller-Stützzellen dargestellt. Die komplexe gliale Architektur der Retinakörper wird in Abbildung 6 C ersichtlich. Radial orientierte Fortsätze der Müller-Stützzellen erstrecken sich über mehrere Schichten. In der IPL, parallel zur Oberfläche der Retinakörper, formen gliale Fasern dichte Bänder. Auch im zentralen Kern der Retinakörper formen sie ein dichtes Netzwerk.

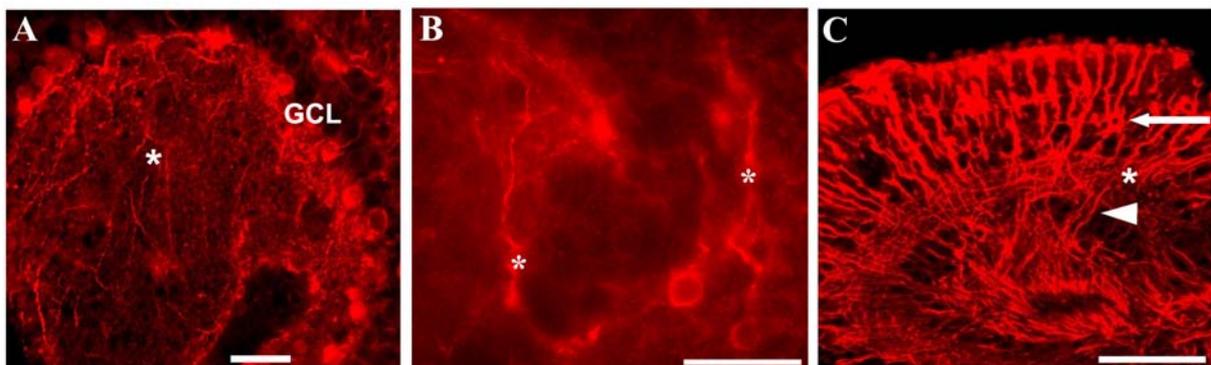


Abbildung 6: Zytoarchitektur der Retinakörper.

A: Schnitt durch einen Retinakörper nach 8 Kultivierungstagen (days in vitro, DIV). Von der Ganglienzellschicht (GCL) geht ein dichtes Geflecht von Dendriten (*) der Ganglienzellen aus.

B: Dendriten (*) der Ganglienzellen.

C: Gliale Struktur des Retinakörpers (12 DIV): Astrozyten und Müller-Stützzellen. Radial orientierte Müller-Stützzellen (Pfeil) erstrecken sich über mehrere Schichten. In der inneren plexiformen Schicht (*) bilden gliale Fasern ein dichtes Band. Gliafasern wachsen auch in den zentralen Kern des Retinakörpers (Pfeilspitze).

A, B: MAP2-Färbung. **C:** GFAP-Färbung.

Der Skalierungsbalken entspricht **A, B:** 25 μ m bzw. **C:** 100 μ m.

3.1.3 Nachweis vaskulärer Strukturen in den Retinakörpern

Silberimprägnation von Schnitten der Retinakörper nach einer Kultivierungszeit von mindestens 1 Woche zeigte, dass Zellfortsätze der Ganglienzellen, Gliafasern sowie vaskulären Strukturen den zentralen Kern der Retinakörper komplett füllten (Abbildung 7 A und B).

Vaskuläre Strukturen konnten auch durch Färbung gegen von-Willebrand-Faktor dargestellt werden, welcher in aktivierten Endothelzellen exprimiert wird. Abbildung 7 C zeigt vor allem im zentralen Kern des Retinakörpers vaskuläre Strukturen.

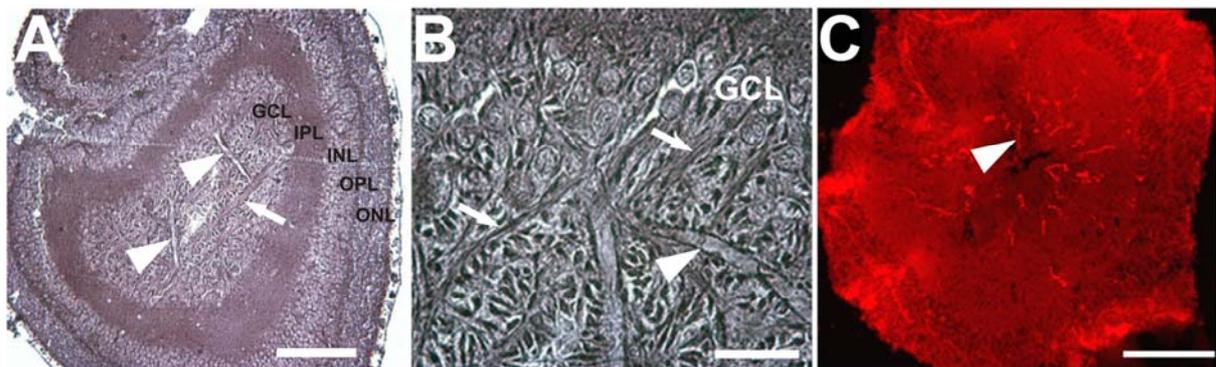


Abbildung 7: Vaskuläre Strukturen in den Retinakörpern.

A: Schnitt durch einen Retinakörper nach 8 Kultivierungstagen (days in vitro, DIV). ONL – äußere Körnerschicht; OPL – äußere plexiforme Schicht; INL - innere Körnerschicht; IPL - innere plexiforme Schicht; GCL – Ganglienzellschicht. Im Inneren des Retinakörpers finden sich Nervenfasern (Pfeil) sowie vaskuläre Strukturen (Pfeilspitzen).

B: Die stärkere Vergrößerung zeigt deutlich die GCL, Nervenfasern (Pfeile) sowie eine vaskuläre Struktur (Pfeilspitze).

C: Von-Willebrand-Faktor-immunreaktive Bereiche stellen vaskuläre Strukturen (Pfeilspitze) vor allem im zentralen Kern des Retinakörpers dar. 12 DIV.

A, B: Silberimprägnation. **C:** Von-Willebrand-Faktor-Färbung.

Der Skalierungsbalken entspricht **A, C:** 100 μ m bzw. **B:** 25 μ m.

3.2 Anwendungen des Modells: Untersuchungen zur Neuroprotektion

Im Folgenden werden Anwendungen des organotypischen Kulturmodells der Retina demonstriert. Die Etablierung eines Modells der Glutamat-induzierten Schädigung der GCL wird beschrieben. Die Wirkung des β -Carbolins Abecarnil sowie des HMG-CoA-Reduktasehemmers Simvastatin werden in diesem Schadensmodell untersucht.

3.2.1 Modell der exzitotoxischen Schädigung der Ganglienzellschicht (GCL)

In der histologischen Färbung wurden Zellen der GCL als geschädigt klassifiziert, wenn mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllt war: Schwellung, Schrumpfung (Pyknosis), oder Fragmentierung des Zellkernes. Nach 7 DIV zeigten die Kontrollkulturen in der histologischen Färbung lediglich in $3,3 \pm 1,8$ % der Zellen der GCL Anzeichen einer Schädigung (Abbildung 8 A). 24-stündige Behandlung mit $500 \mu\text{M}$ Glutamat führte zu einer Schädigung von $17,0 \pm 6,7$ % dieser Zellen. 96-stündige Behandlung mit $500 \mu\text{M}$ Glutamat (vom 3. bis 7. DIV) resultierte in einer Schädigung von $18,1 \pm 5,6$ % dieser Zellen. Dieser Schaden ist zwar signifikant jedoch relativ gering für ein Modell, in dem die neuroprotektive Wirkung einer Substanz nachzuweisen ist. Bei Applikation von 5 mM Glutamat für 24 h stieg die Anzahl der geschädigten Zellen der GCL auf $42,5 \pm 8,3$ % (Abbildung 8 B). Dies stellt einen robusten Schaden dar, der sich für Untersuchungen potentiell neuroprotektiver Substanzen gut eignet. Bei der Auswertung der histologischen Färbung wurde nicht zwischen Apoptose und Nekrose differenziert.

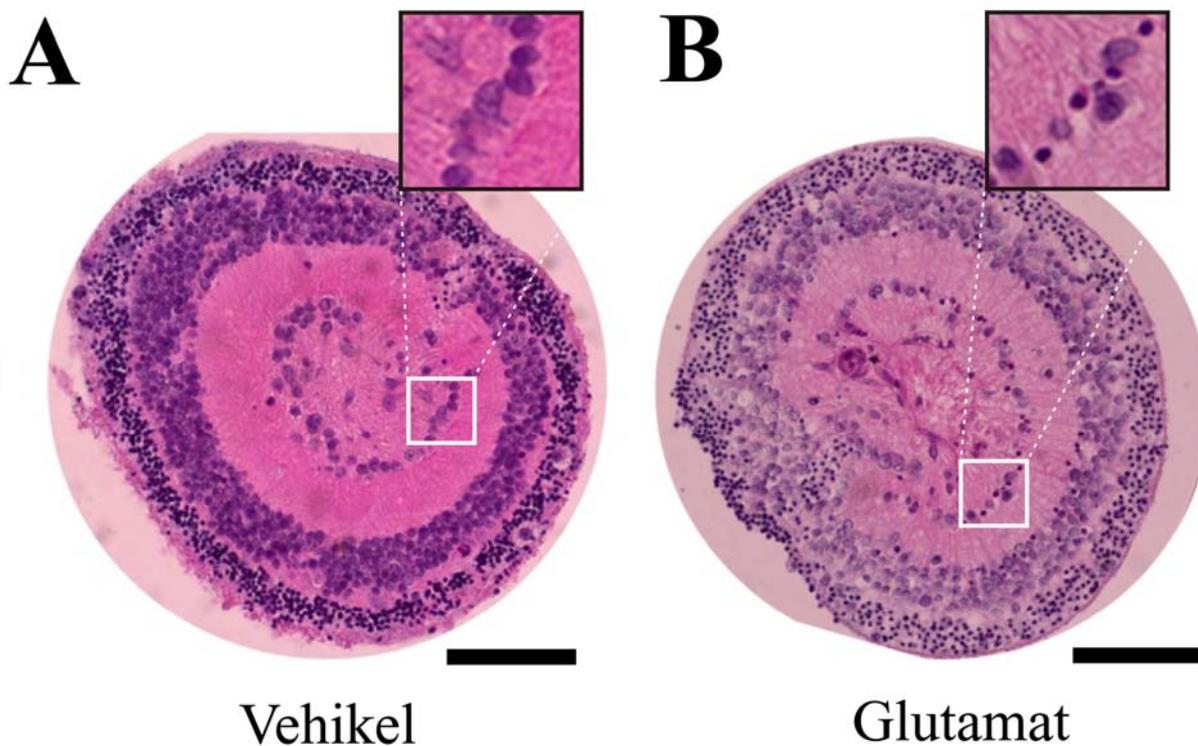


Abbildung 8: Glutamat-induzierte Zellschädigung in organotypischen Retinakulturen nach 7 Kultivierungstagen.

A: In der Ganglienzellschicht (GCL; s. Ausschnittsvergrößerung) un behandelter Retinakörper finden sich kaum Anzeichen einer Schädigung ($3,3 \pm 1,8$ % der Zellen).

B: Über 24 h mit 5 mM Glutamat behandelte Retinakörper weisen eine deutliche Schädigung der GCL auf ($42,5 \pm 8,3$ % der Zellen).

A, B: Hämatoxylin-Eosin-Nissl-Färbung. Der Skalierungsbalken entspricht 100 μ m.

Als sehr sensitivem Marker des Zelltods wurde die TUNEL-Färbung (Terminale-Desoxynukleotidyl-Transferase-vermitteltes dUTP-Biotin „nick end labeling“), welche Doppelstrangbrüche in der DNA darstellt, mit einer DAPI-Gegenfärbung der Zellkerne kombiniert. Die Zellen wurden als TUNEL-positiv klassifiziert, wenn sie ein deutliches nukleäres Signal mit kondensierten Nuklei ohne zytoplasmatische Anfärbung aufwiesen. Wie aus Abbildungen 9 A bis C ersichtlich wird, fanden sich in den Kontrollkulturen einige wenige TUNEL-positive Zellen in der GCL ($1,7 \pm 0,8 \%$). Durch 24-stündige Behandlung mit 5 mM Glutamat stieg die Anzahl der TUNEL-positiven Zellen der GCL auf $25,3 \pm 10,6 \%$ (Abbildung 9 D bis F).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die 24-stündige Behandlung mit 5 mM Glutamat zu einer robusten Schädigung der GCL führt, welche sich sowohl mit der Hämatoxylin-Eosin-Nissl-Färbung als auch mit der TUNEL-Färbung quantitativ erfassen lässt.

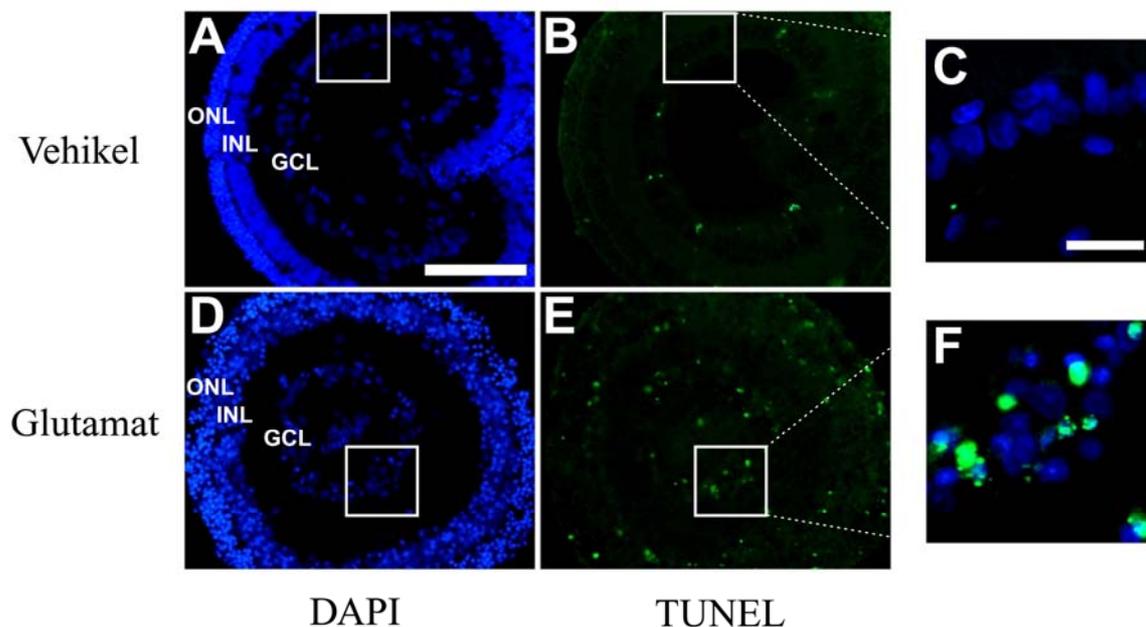


Abbildung 9: Geschädigte Zellen in Glutamat-behandelten organotypischen Retinakulturen nach 7 Kultivierungstagen. ONL – äußere Körnerschicht; INL – innere Körnerschicht, GCL – Ganglienzellschicht. **A, B:** Schnitt durch einen unbehandelten Retinakörper. **C:** Ausschnittsvergrößerung aus der GCL. Nur wenige Zellen der GCL sind TUNEL-positiv ($1,7 \pm 0,8 \%$). **D, E:** 24-stündige Behandlung mit 5 mM Glutamat. **F:** Ausschnittsvergrößerung aus der GCL. $25,3 \pm 10,6 \%$ der Zellen sind TUNEL-positiv. **A, D:** DAPI-Färbung. **B, E:** TUNEL-Färbung. **C, F:** DAPI-TUNEL-Färbung. Der Skalierungsbalken entspricht **A, B, D, E:** 100 μm bzw. **C, F:** 25 μm .

3.2.2 Abecarnil schützt nicht vor Glutamat-induzierter Schädigung der GCL

Inhibition der NMDA-Rezeptoren durch Koapplikation des nichtkompetitiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801 in einer Konzentration von 10 μ M zusammen mit 5 mM Glutamat für 24 h reduzierte die Anzahl geschädigter Zellen der GCL von $42,5 \pm 8,3$ % auf $26,7 \pm 7,7$ % (Abbildung 10 und 11, Tabelle 1).

Koapplikation von Abecarnil in Konzentrationen von 1 nM bis 1 μ M zusammen mit 5 mM Glutamat für 24 h bewirkte keine Verringerung der nur durch Glutamat bewirkten Zellschädigung (Abbildung 10 und 11, Tabelle 1). Koapplikation von 10 μ M Abecarnil zusammen mit 5 mM Glutamat bewirkte wiederholt eine nicht nur auf die GCL beschränkte deutliche Schwellung der Zellfortsätze (Abbildung 10 H).

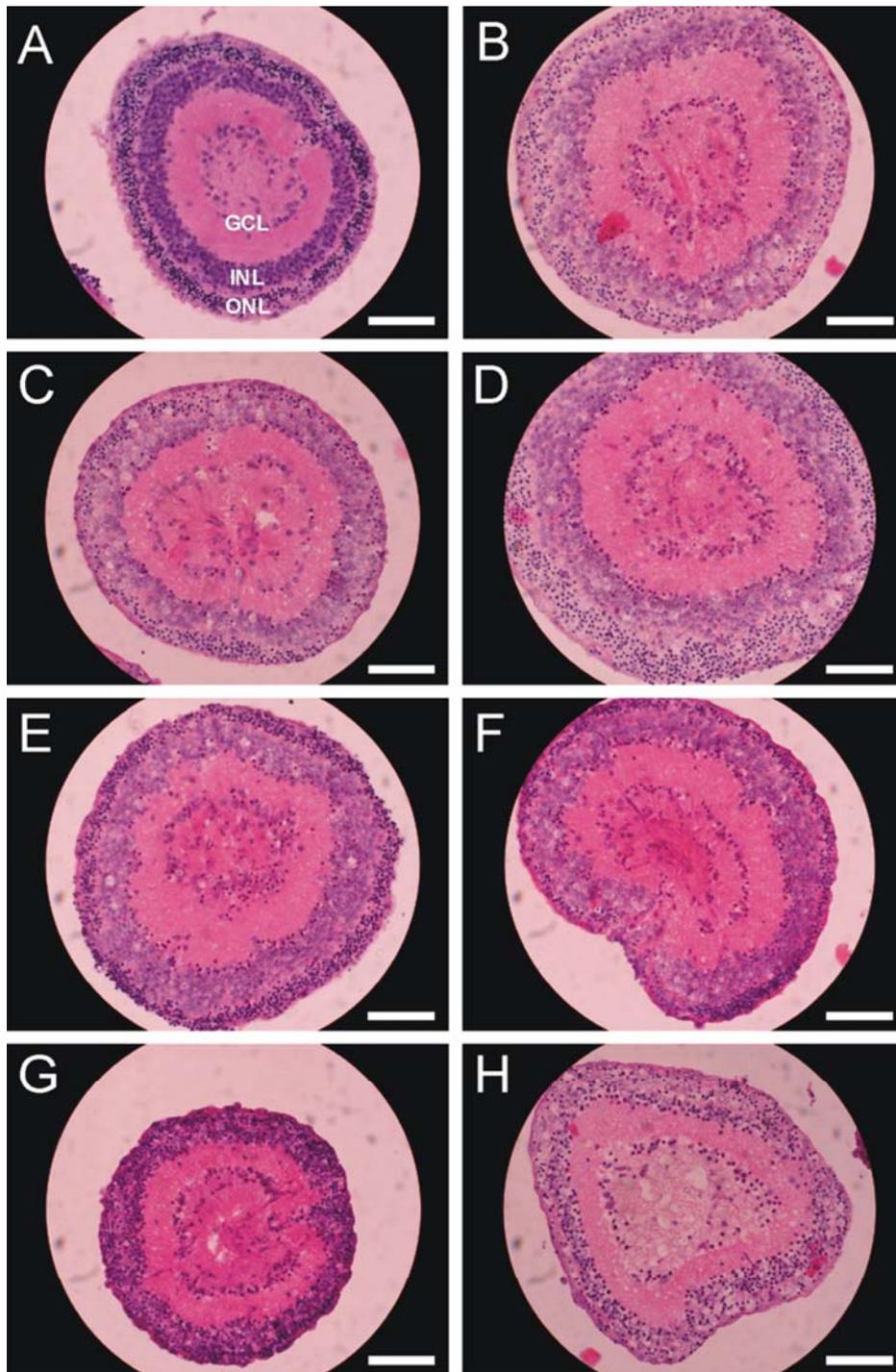


Abbildung 10: Repräsentative Schnitte durch die Retinakörper, welche nach 6 Kultivierungstagen (days *in vitro*, DIV) für 24 h wie folgt behandelt wurden:

A: Vehikel. ONL – äußere Körnerschicht; INL – innere Körnerschicht; GCL – Ganglienzellschicht. 7 DIV.

B: 5 mM Glutamat; **C:** 10 µM MK-801 + Glutamat; **D:** 1 nM Abecarnil + Glutamat;

E: 10 nM Abecarnil + Glutamat; **F:** 100 nM Abecarnil + Glutamat; **G:** 1 µM Abecarnil + Glutamat;

H: 10 µM Abecarnil + Glutamat. Beachte die Schwellung der zellulären Fortsätze.

A-H: Hämatoxylin-Eosin-Nissl-Färbung. Der Skalierungsbalken entspricht 100 µm.

Behandlungsgruppen	Anteil geschädigter Zellen der GCL (%)
Vehikel	3,3 ± 1,8
Glutamat	42,5 ± 8,3 *
MK-801 + Glutamat	26,7 ± 7,7 **
1 nM Abecarnil + Glutamat	42,4 ± 8,8
10 nM Abecarnil + Glutamat	42,1 ± 6,9
100 nM Abecarnil + Glutamat	45,6 ± 4,4
1 µM Abecarnil + Glutamat	52,2 ± 5,9

Tabelle 1: 24-stündige Behandlung mit 5 mM Glutamat induziert einen robusten Schaden in der Ganglienzellschicht (GCL), welcher sich durch Koapplikation von 10 µM MK-801 signifikant verringert. Abecarnil zeigt keinen neuroprotektiven Effekt. Die Ergebnisse aus 3-6 unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst. * $p < 0,001$ versus Vehikel; ** $p < 0,01$ versus Glutamat.

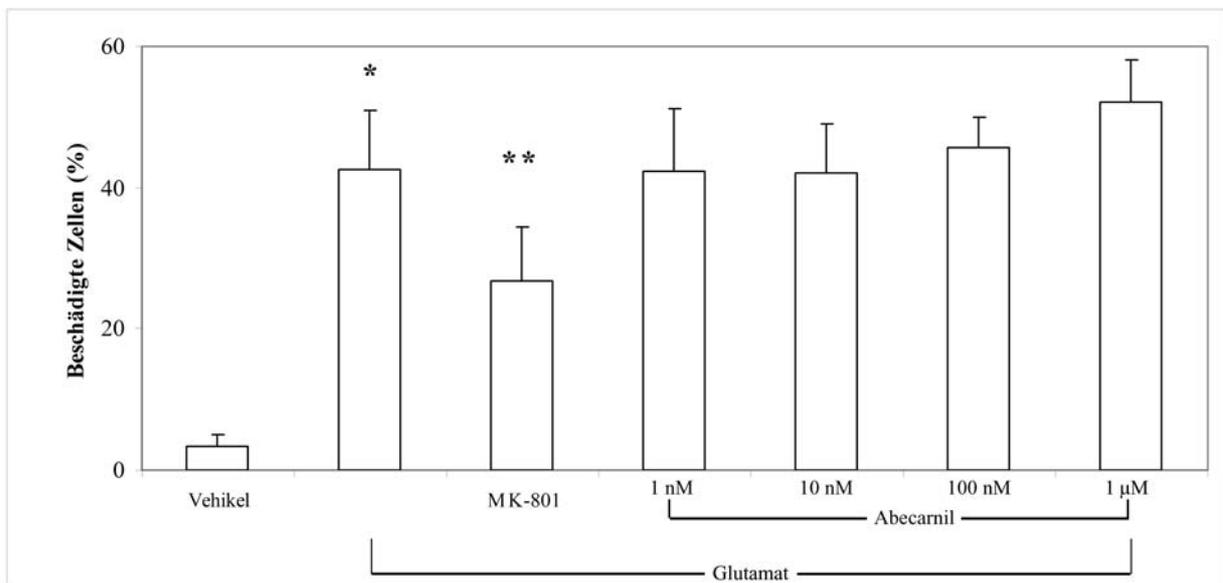


Abbildung 11: Der NMDA-Rezeptor-Antagonist MK-801 verringert die Glutamat-induzierte Schädigung der Ganglienzellschicht (GCL) in organotypischen Retinakulturen. Das β -Carbolin Abecarnil zeigt keine protektive Wirkung. Nach 6 Kultivierungstagen wurden die Retinakörper für 24 h wie in der Abbildung dargestellt behandelt. Die durch 5 mM Glutamat induzierte Schädigung von $42,5 \pm 8,3$ % wurde durch Koapplikation von 10 µM MK-801 auf $26,7 \pm 7,7$ % verringert. Die Daten werden präsentiert als Verhältnis der geschädigten Zellen der GCL zur Gesamtzahl der Zellen der GCL.

Die Ergebnisse aus 3-6 unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst. * $p < 0,001$ versus Vehikel; ** $p < 0,01$ versus Glutamat.

3.2.3 Simvastatin schützt vor Glutamat-induziertem Zelltod in der GCL

Durch Doppelfärbung mittels TUNEL und DAPI wurde die Anzahl geschädigter Zellkerne ins Verhältnis zur Gesamtzahl der Zellkerne in der GCL gesetzt. Die Zellen wurden als TUNEL-positiv klassifiziert, wenn sie ein deutliches nukleäres Signal mit kondensierten Nuklei ohne zytoplasmatische Anfärbung aufwiesen.

Durch Vorbehandlung mit 100 nM Simvastatin am 3. Kultivierungstag wurde die Glutamat-induzierte Schädigung der GCL vermindert. Die Anzahl der TUNEL-positiven Zellen der GCL reduzierte sich signifikant von $25,3 \pm 10,6$ % auf $4,3 \pm 0,4$ % (Abbildung 12 und 13, Tabelle 2).

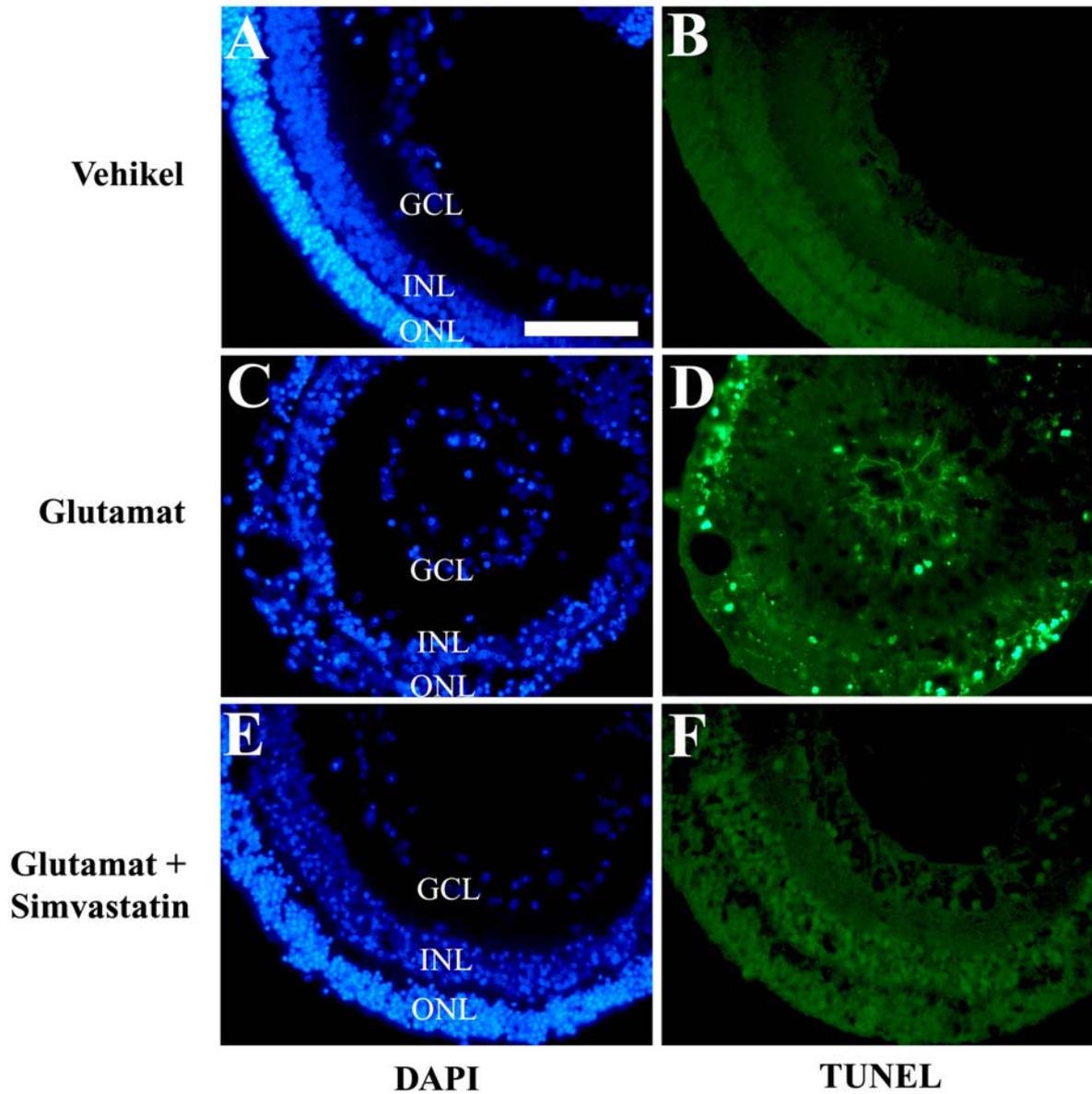


Abbildung 12: Repräsentative Schnitte durch Retinakörper, welche wie folgt behandelt wurden:
A, B: Vehikel; ONL – äußere Körnerschicht; INL – innere Körnerschicht; GCL – Ganglienzellschicht;
C, D: 5 mM Glutamat für 24 h. TUNEL-positive Zellen finden sich u.a. in der GCL.
E, F: 100 nM Simvastatin + 5 mM Glutamat. 7 Kultivierungstage (days in vitro, DIV).
A, C, E: DAPI-Färbung. **B, D, F:** TUNEL-Färbung. Der Skalierungsbalken entspricht 100 μ m.

Behandlungsgruppen	Anteil geschädigter Zellen der GCL (%)
Vehikel	1,7 ± 0,8
Glutamat	25,3 ± 10,6 *
Simvastatin + Glutamat	4,3 ± 0,4 **

Tabelle 2: 24-stündige Behandlung mit 5 mM Glutamat führt zu Zellschädigung in der Ganglienzellschicht (GCL). Die Anzahl TUNEL-positiver Zellen der GCL wird vermindert durch Vorbehandlung mit 100 nM Simvastatin. Die Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst.

* $p < 0,05$ versus Vehikel; ** $p < 0,05$ versus Glutamat.

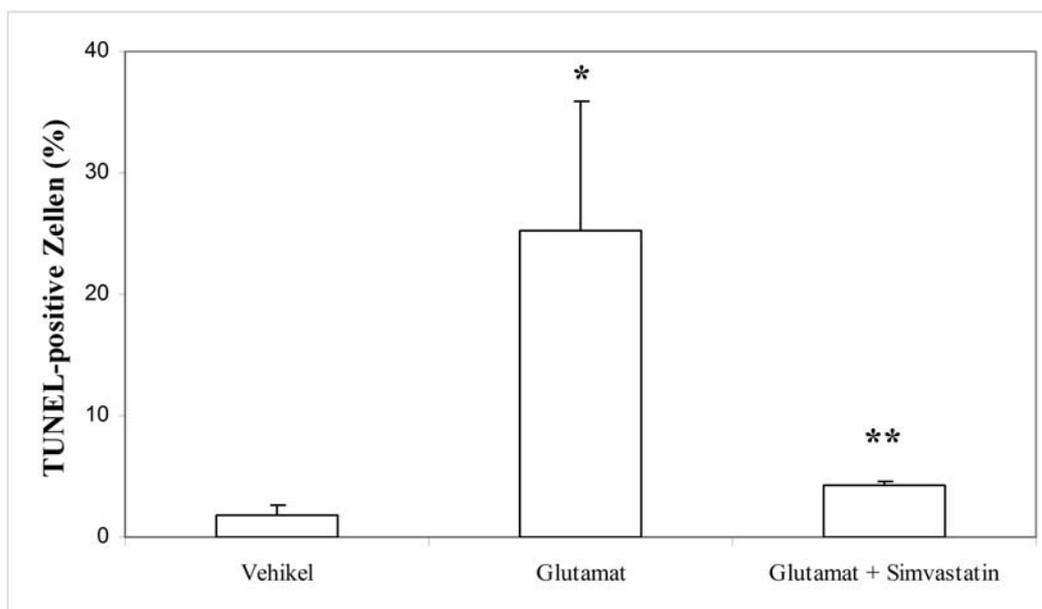


Abbildung 13: Vorbehandlung mit 100 nM Simvastatin verringert die durch 5 mM Glutamat induzierte Schädigung der Ganglienzellschicht in organotypischen Retinakulturen.

* $p < 0,05$ versus Vehikel; ** $p < 0,05$ versus Glutamat.