

4. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines für die Untersuchung retinaler bzw. neurodegenerativer Erkrankungen geeigneten organotypischen Kulturmodells der adulten Retina. Bezüglich der Charakterisierung dieses Modells können die eingangs formulierten Fragestellungen wie folgt zusammenfassend beantwortet werden:

1. Die organotypische Retina-Kultivierung der adulten Ratte ist über Wochen möglich. Limitiert wird sie durch die über 1 bis 3 Monate *in vitro* zu beobachtende Degeneration der äußeren Körnerschicht (ONL).
2. Die axotomisierten retinalen Ganglienzellen können mindestens 3 Monate *in vitro* überleben. Ihre aussprossenden Nervenfasern füllen in der ersten Kultivierungswoche allmählich den zentralen Kern des Retinakörpers.
3. In den organotypischen Kulturen der adulten Retina finden sich in allen Schichten zahlreiche Astrozyten und Müller-Stützzellen.
4. In den Retinakörpern können vaskuläre Strukturen dargestellt werden.
5. 24-stündige Behandlung mit 5 mM Glutamat bewirkt eine deutliche Schädigung der Ganglienzellschicht (GCL), welche sich sowohl mit einer Hämatoxylin-Eosin-Nissl-Färbung als auch einer TUNEL-Färbung quantitativ erfassen lässt.
6. In dem Modell der Glutamat-induzierten Schädigung der GCL ist ein protektiver Effekt des NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801, nicht jedoch des β -Carbolins Abecarnil, nachweisbar.
7. Vorbehandlung mit 100 nM Simvastatin schützt vor Glutamat-induziertem Zelltod in der GCL.

In den folgenden Abschnitten sollen diese Ergebnisse diskutiert werden.

4.1 Besonderheiten im Vergleich zu anderen Kulturmodellen der Retina

In dieser Arbeit stellen wir erstmalig ein für die Erforschung retinaler bzw. neurodegenerativer Erkrankungen geeignetes Modell der organotypischen Kultivierung der adulten Retina vor. Unter Verwendung einer ursprünglich für die organotypische Kultivierung des Hippocampus entworfenen Wälzvorrichtung (Victorov *et al.*, 2001) können Fragmente der postnatalen (Victorov *et al.*, 2004) bzw. nun auch adulten Netzhaut der Ratte *in vitro* flottieren unter Beibehaltung einer organotypischen Struktur. Da eine große Anzahl organotypischer Retinakörper in einer Laborflasche kultiviert werden kann, bietet sich dieses System für Schadensmodelle bzw. pharmakologische Behandlung mit nachfolgender histologischer bzw. immunzytochemischer Evaluierung an.

In unserem experimentellen System fanden sich außer dem Aussprossen von Nervenfasern der axotomisierten Ganglienzellen in den zentralen Kern der kugelförmigen Retinakörper auch nach 12 DIV keine Veränderungen der Zytoarchitektur. Auch nach 90 DIV lag eine kugelförmige Struktur mit den für die Retina typischen Schichten vor, welche jedoch deutliche Degeneration der ONL aufwies.

Während der ersten Kultivierungstage besaßen die Retinakörper eine zentrale Kavität, welche sich in den darauf folgenden Kultivierungstagen allmählich füllte mit migrierenden (und / oder proliferierenden) Astrozyten und Zellen mit Makrophagen-ähnlicher Morphologie, aussprossenden Nervenfasern und vaskulären Strukturen. Nach einer Woche der Reorganisation *in vitro* lagen für die adulte Netzhaut typische neuro-neuronale und neuro-gliale Beziehungen vor. Wir nehmen an, dass die dreidimensionale Organisation das Überleben axotomisierter Ganglienzellen in unseren organotypischen Retinakulturen wesentlich begünstigt.

In verschiedenen *in-vitro*-Untersuchungen an isolierten retinalen Ganglienzellen (Kashiwagi *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2002) bzw. kultivierten Explantaten der Netzhaut (Bähr und Bunge, 1990) konnte der protektive Effekt glialer Zellen demonstriert werden; und auch in unseren organotypischen Kulturen der adulten Retina dürften die in allen Schichten nachweisbaren zahlreichen Gliazellen hochrelevant für das Überleben

neuronaler Zellen und das Aussprossen der Nervenfasern der axotomisierten Ganglienzellen sein. Das Überleben retinaler Ganglienzellen bis 4 Monate *in vitro* sowie auswachsende Fasern nach 1 bis 4 Wochen *in vitro* konnten in stationären Netzhautexplantaten des erwachsenen Menschen in beschichteten Gewebekulturschalen beobachtet werden (Kim und Takahashi, 1988).

In anderen Modellen wurde der Sehnerv der adulten Ratte *in vivo* durchtrennt und 1 bis 6 Wochen später die Netzhaut in beschichteten Gewebekulturschalen kultiviert, wobei sich auswachsende Nervenfasern bereits nach 2 DIV zeigten (Bähr *et al.*, 1988; Thanos und Vanselow, 1989). In der kultivierten Retina eines 70-jährigen Patienten konnte die axonale Regeneration von Ganglienzellen unter Behandlung mit brain derived neurotrophic factor (BDNF) nachgewiesen werden (Takano *et al.*, 2002). Auch isolierte retinale Ganglienzellen zeigten axonale Regeneration in Monolayer-Zellkulturen der postnatalen und adulten Netzhaut (Luo *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu zeigten viele Studien vollständige oder partielle Degeneration der Ganglienzellen nach Durchtrennung des Axons in organotypischen Kulturen der neonatalen und postnatalen Retina. In neonatalen organotypischen Retinakulturen wurde anteilige Degeneration der Ganglienzellen nach 24 h *in vitro* beobachtet (Pinzón-Duarte *et al.*, 2000; Pérez-Léon *et al.*, 2003; Engelsberg *et al.*, 2004); in anderen Kulturen überlebten Ganglienzellen 4 Wochen *in vitro* (Mosinger Ogilvie *et al.*, 1999).

In-vivo-Studien, in denen der Sehnerv durchtrennt wurde, zeigten, dass in der neonatalen Retina die meisten Ganglienzellen innerhalb einiger Tage in den apoptotischen Zelltod eintreten (Rabacchi *et al.*, 1994), in der adulten Retina in zwei Wochen (Villegas-Pérez *et al.*, 1993; Berkelaar *et al.*, 1994; Garcia-Valenzuela *et al.*, 1994; Kermer *et al.*, 2001).

Unser neues Kulturmodell der adulten Retina zeigt auch nach 90 DIV einen organotypischen Aufbau mit gut erhaltener GCL, jedoch deutlicher Degeneration der äußeren Körnerschicht.

Die in dieser Arbeit beschriebene Formation von Retinakörpern der adulten Ratte ähnelt der von Victorov und Mitarbeitern beschriebenen Formation von Retinakörpern

der postnatalen Ratte (Victorov *et al.*, 2004). Die Struktur der Retinakörper weist jedoch einige essentielle Unterschiede auf, welche bedingt sind durch die Unterschiede im Stadium der retinalen Entwicklung zu Beginn der Kultivierung (Horsburgh und Sefton, 1987; Perry *et al.*, 1983; Young, 1984). Die Entwicklung der isolierten postnatalen Retina dauert während der Kultivierung an (Engelsberg *et al.*, 2005). Dies führte zu strukturellen Charakteristiken, die bei der organotypischen Kultivierung der adulten Retina nicht auftreten, wie beispielsweise die Formation von Retinakörpern aus multiplen Schichten, Konfluenz mehrerer Retinakörper und die Ausbildung von Rosetten in der ONL (Victorov *et al.*, 2004).

Bisher konnten die retinalen Auswirkungen pathologischer Bedingungen wie Exzitotoxizität, Hypoxie oder Hypoglykämie, an isolierten Zellen der Netzhaut untersucht werden. Derartige Untersuchungen demonstrierten, dass die Ganglienzellen besonders vulnerabel auf ischämische Stimuli reagieren (Luo *et al.*, 2001). Mit der hier beschriebenen Methode können nun, ähnlich wie *in vivo*, verschiedene pathologische Prozesse in einem organotypischen Modell der Retina studiert werden.

Mit dieser neuen Methode der organotypischen Retina-Kultivierung der adulten Ratte präsentieren wir ein Modell, welches besonders geeignet ist für Untersuchungen der retinalen Regeneration sowie Neuroprotektion.

4.2 Studien zur Neuroprotektion: Abecarnil

An kultivierten kortikalen Neuronen konnte in einem Modell der kombinierten Sauerstoff- und Glukosedepriavation (OGD) sowie der NMDA-Exzitotoxizität der protektive Effekt des β -Carbolins Abecarnils gezeigt werden (Ruscher *et al.*, 2006).

Das neuroprotektive Potential Abecarnils untersuchten wir weiter in unserem komplexen Modell der organotypischen Kulturen der adulten Retina, welches den *in-vivo*-Bedingungen stärker ähnelt. Zur Etablierung eines Schadensmodells verwendeten wir den im ZNS ubiquitären exzitotoxischen Neurotransmitter Glutamat, welcher beim Mechanismus neurodegenerativer Erkrankungen eine wesentlichere Rolle einnimmt als der synthetische und stark Rezeptor-spezifische Agonist NMDA. 24-stündige Behandlung mit 5 mM Glutamat verursachte eine reproduzierbare Schädigung von mehr als 40 % der Neuronen der GCL (Hämatoxylin-Eosin-Nissl-Färbung). Mit den in diesen Untersuchungen verwendeten Methoden der Hämatoxylin-Eosin-Nissl-Färbung bzw. TUNEL-Färbung war es nicht möglich, in der GCL amakrine Zellen von den Ganglienzellen zu unterscheiden, so dass bezüglich der induzierten Schädigung der GCL keine Aussage über den jeweiligen Zelltyp getroffen werden kann. Auf die für die Schädigung der GCL in postnatalen Retinakulturen notwendige vergleichsweise hohe Glutamat-Dosis wurde bereits mehrfach in der Literatur hingewiesen (Yoneda *et al.*, 2003; Vallazza-Deschamps *et al.*, 2005), und auch in unseren organotypischen Kulturen der adulten Retina verwendeten wir eine Glutamatdosis im millimolar-Bereich. Die Dauer der Glutamatexposition in unserem Schadensmodell, 24 h, modelliert eher Aspekte einer chronischen Schädigung retinaler Ganglienzellen, wie sie auch beim Glaukom zu beobachten ist.

In unseren organotypischen Retinakulturen wurde die Glutamat-induzierte Schädigung der GCL durch Koapplikation des potenten NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801 (Wong *et al.*, 1986) signifikant abgeschwächt, jedoch nicht vollständig geblockt. Wie bereits in dissoziierten Retinakulturen nachgewiesen (Luo *et al.*, 2004), vermuten wir auch in unserem Modell eine Beteiligung anderer Glutamat-Rezeptor-Spezies, vor allem AMPA und Kainat-Rezeptoren (Jacoby und Wu, 2001), an der Schädigung der

GCL. Durch zusätzliche Verabreichung des AMPA/Kainat-Rezeptorblockers CNQX werden wir in zukünftigen Versuchsreihen dieser Hypothese nachgehen.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen an kultivierten kortikalen Neuronen (Ruscher *et al.*, 2006) konnte Abecarnil in den organotypischen Kulturen der adulten Retina die Glutamat-induzierte Schädigung der GCL nicht verhindern. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass das sehr lipophile Abecarnil (Vorobjev *et al.*, 1995) in den Plasmamembranen der äußeren retinalen Schichten akkumuliert und deshalb die GCL nicht erreichen kann. Aufgrund der Beobachtung, dass Abecarnil in höheren Konzentrationen (10 μ M) zusätzlich zum Glutamat auch in der GCL toxisch wirkt, leiten wir jedoch ab, dass Abecarnil durchaus bis in die GCL der organotypischen Retinakulturen gelangt.

Sowohl kortikale Neurone (Eder *et al.*, 2001) als auch retinale Ganglienzellen (Yang, 2004) besitzen GABA-Rezeptoren. Jedoch können quantitative Unterschiede in der Expression des GABA-Rezeptors, Unterschiede in der Expression anderer Neurotransmitter (insbesondere Glutamat-Rezeptoren), durch das neuronale Netzwerk entstehende Effekte, oder auch der Einfluß nicht-neuronaler Zellen beitragen zu den verschiedenen Effekten Abecarnils in den beiden Modellen.

Zusammenfassend stellen wir fest, dass wir momentan die Frage noch nicht endgültig beantworten können, warum Abecarnil einen anti-exzitotoxischen Effekt in kultivierten kortikalen Neuronen zeigt, nicht jedoch in der GCL organotypischer Kulturen der adulten Retina. Wir schlagen vor, die Wirkung von Abecarnil in *in-vivo*-Modellen des Neokortex zu untersuchen, z.B. in Modellen des Schlaganfalls. Für die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen der Retina, wie dem Glaukom, scheint Abecarnil nach derzeitiger Datenlage weniger erfolgversprechend zu sein.

4.3 Studien zur Neuroprotektion: Simvastatin

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass Vorbehandlung mit 100 nM Simvastatin die GCL vor Glutamat-induziertem Zelltod in einem organotypischen Kulturmodell der adulten Retina schützt. Die Tatsache, dass einerseits in der histologischen Färbung die als geschädigt klassifizierten Zellen der GCL eher morphologische Charakteristiken des apoptotischen Zelltods aufwiesen (Schrumpfung oder Fragmentierung des Zellkerns), sowie andererseits in der TUNEL-Färbung $25,3 \pm 10,6$ % der Zellen der GCL TUNEL-positiv waren, deutet darauf hin, dass es sich hierbei am ehesten um apoptotischen Zelltod handelte. In zukünftigen Experimenten werden wir untersuchen, ob der protektive anti-exzitotoxische Effekt von Simvastatin durch gleichzeitiger Gabe von Mevalonat nicht aufgehoben wird, was einen cholesterol-unabhängigen Effekt nachweisen würde.

Zuvor konnten Bösel und Mitarbeiter einen protektiven Effekt durch Statine (100 nM bis 1 μ M) in einem Modell der Glutamat-Exzitotoxizität bereits in Untersuchungen an kultivierten kortikalen Neuronen nachweisen (Bösel *et al.*, 2005). Dabei reduzierte das Statin die NMDA-Rezeptor-Aktivität und verringerte somit den Glutamat-induzierten intrazellulären Calcium-Einstrom, welcher exzitotoxischen Zelltod vermittelt (Choi 1995). Da der protektive Effekt nur bei Vorbehandlung (2 bis 4 Tage) mit dem Statin zu beobachten war, ist es unwahrscheinlich, dass direkte pharmakologische Interaktionen des Statins mit Glutamat-Rezeptoren verantwortlich sind. Noch ungeklärt ist die Frage, welche der möglichen indirekten Effekte, Veränderungen der Genexpression, der Rezeptor-Untereinheiten (Bickler und Buck, 1998) oder post-translationale Mechanismen, verantwortlich für die neuroprotektive Wirkung sind.

Kürzlich konnte der neuroprotektive Effekt von Statinen auch an der Netzhaut gezeigt werden. In einem Glaukommodell konnte die Protektion retinaler Ganglienzellen durch Induktion eines Hitzeschockproteins demonstriert werden (Caprioli *et al.*, 2003).

Aufgrund der Ergebnisse unserer und anderer Arbeitsgruppen stellen wir die Hypothese auf, dass Statine möglicherweise auch bei Patienten mit Glaukom die Progression dieser Erkrankung aufhalten. Eine große Anzahl von Patienten wird mit

HMG-CoA-Reduktasehemmern behandelt; viele davon sind in klinischen Studien eingeschlossen. Wir regen deshalb an, klinische Studien an Patienten, die Statine einnehmen, dahingehend zu erweitern, die Inzidenz bzw. die Progression des Glaukoms mit der von Patienten zu vergleichen, welche keine HMG-CoA-Reduktasehemmer einnehmen.

4.4 Ausblick

Aus den bisherigen Untersuchungen an dem hier beschriebenen neuen organotypischen Kulturmodell der adulten Retina ergeben sich weitere interessante Fragestellungen. Die Existenz vaskulärer Strukturen in den organotypischen Retinakörpern nach 1 bis 2 Wochen *in vitro* wirft die Frage auf, ob wir möglicherweise Angiogenese in der Netzhaut beobachtet haben. Eine Vielzahl häufiger, schwerwiegender Erkrankungen der Netzhaut ist auf Neovaskularisation zurückzuführen. Sowohl bei der diabetischen Retinopathie als auch bei retinalen Thrombosen löst die chronische Hypoxie der Retina die Bildung von endothelialeem Wachstumsfaktor, VEGF (Stone *et al.*, 1995; Neufeld *et al.*, 1999), aus. Die resultierenden Neovaskularisationen können zu rezidivierenden Glaskörperblutungen und einer Netzhautablösung führen. Bei der feuchten Makuladegeneration werden die Photorezeptoren der Makula von subretinalen Neovaskularisationen zerstört, die der Choriokapillaris entstammen. Neovaskularisationen der Iris, als Rubeosis iridis bezeichnet, können zu einem unbehandelbaren Neovaskularisationsglaukom führen. Verschiedene Kulturmodelle wurden zur Untersuchung der retinalen Neoangiogenese entwickelt. In einem *in-vitro*-Modell isolierter Müller-Stützzellen konnten diese als ein Regulator der retinalen Angiogenese identifiziert werden. Unter ischämischen bzw. hypoxischen Bedingungen sekretieren Müller-Stützzellen mehr VEGF und fördern somit Angiogenese (Eichler *et al.*, 2004). In Kulturen der menschlichen Netzhaut, welche in eine Fibrinmatrix eingebettet wurden, konnte Neoangiogenese bereits nach 24 h *in vitro* beobachtet werden (Knott *et al.*, 1999). Allerdings waren zu diesem Zeitpunkt bereits sämtliche Zellschichten der Retina degeneriert.

Somit besteht ein großes Interesse an einem organotypischen Kulturmodell der adulten Retina, in welchem retinale Neovaskularisation studiert werden könnte. In aktuellen Experimenten quantifizieren wir den jeweiligen Gefäßstatus der 0 bis 90 Tage kultivierten Retinakörper, indem wir Endothelzellen durch Antikörper gegen von-Willebrandt-Faktor bzw. CD31 (Semkova *et al.*, 2003) identifizieren. Somit werden wir Informationen darüber erhalten, ob Gefäße proliferieren bzw. degenerieren und fänden unsere Arbeitshypothese der Angiogenese im organotypischen Kulturmodell der adulten Retina bestätigt oder aber widerlegt.