

Aus dem Department für Augenheilkunde Tübingen
Universitäts-Augenklinik

**Evaluation von Gliazellmarkern an einem
organotypischen Hypoxiemodell der Netzhaut**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Melchinger, Marion Silke

2019

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Spitzer

2. Berichterstatter: Professor Dr. K.S. Thaler

Tag der Disputation: 11.05.2019

**Meinen Eltern
und meiner Schwester**

Inhaltsverzeichnis

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung.....	10
1.1 Die Gliazellen.....	10
1.1.1 Die Makroglia.....	12
1.1.2 Die Mikroglia.....	13
1.2 Die Gliose.....	15
1.2.1 Die Müllerzellgliose.....	15
1.2.2 Die Mikroglie.....	16
1.3 Die Gliazellen in der erkrankten Retina.....	18
1.3.1 Diabetische Retinopathie.....	18
1.3.2 Glaukom.....	19
1.3.3 Traumata.....	19
1.3.4 Ischämie.....	20
1.4 Therapieformen der Gliose.....	22
1.4.1 Hypothermie.....	22
1.4.2 Immunsuppressive Therapie.....	22
1.4.3 Weitere Therapieansätze.....	24
1.5 Der Zentralarterienverschluss (ZAV).....	25
1.5.1 Ursachen und Risikofaktoren.....	26
1.5.2 Therapie des ZAV.....	26
1.6 Die Vorversuche.....	28
1.6.1 Entwicklung der Ischämiekammer.....	28
1.6.2 Ergebnisse der Vorversuche.....	29
1.7 Ziel dieser Arbeit.....	30
2 Material und Methoden.....	31
2.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....	31
2.2 Geräte.....	32
2.3 Lösungen.....	32
2.3.1 TBS-Puffer (10x) (Tris buffered saline).....	32
2.3.2 TBS-Tween (0,1 %).....	32
2.3.3 10 % BSA + 0,5 % Triton X-100 in PBS.....	32

Inhaltsverzeichnis

2.3.45 % BSA in PBS	32
2.4 Methoden	33
2.4.1 Ischämie	33
2.4.2 Glutamat	33
2.4.3 Hypothermie	33
2.4.4 CSA	33
2.5 Färbung und Auswertung	34
2.5.1 Färbung mit GFAP-Antikörpern	34
2.5.2 Färbung mit CD11b-Antikörpern	34
2.5.3 DAPI (4'6'-diamidino-2-phenylindole)	35
2.5.4 Färbeprotokoll (GFAP + DAPI)	35
2.5.5 Färbeprotokoll (CD11b + DAPI)	35
2.5.6 Fotos und Auswertung	36
2.6 Statistische Auswertung	36
3 Ergebnisse	37
3.1 Glutamatstress	37
3.1.1 Makrogliareaktion nach Glutamatstress	37
3.1.2 Mikrogliareaktion nach Glutamatstress	40
3.2 Ischämie	42
3.2.1 Makrogliareaktion nach Ischämie	42
3.2.2 Mikrogliareaktion nach Ischämie	47
3.3 Hypothermie	50
3.3.1 Makrogliareaktion nach Hypothermie	51
3.3.2 Mikrogliareaktion nach Hypothermie	53
3.4 Therapie mit Hypothermie bei Glutamatstress	55
3.4.1 Makrogliareaktion nach Hypothermie und 1 mM Glutamat	55
3.5 Therapie mit Hypothermie nach Ischämie	57
3.5.1 Makrogliareaktion nach Hypothermie und Ischämie	57
3.5.2 Mikrogliareaktion nach Hypothermie und Ischämie	59
3.6 Cyclosporin A (CSA)	61
3.6.1 Makrogliareaktion nach CSA	61
3.6.2 Mikrogliareaktion nach CSA	63
3.7 CSA und Ischämie	66
3.7.1 Makrogliareaktion nach CSA und Ischämie	66
3.7.2 Mikrogliareaktion nach CSA und Ischämie	68
4 Diskussion	71

Inhaltsverzeichnis

4.1 Die Gliazellen in der Gewebekultur	71
4.2 Die Glutamat Versuche	73
4.3 Die Ischämie Versuche	75
4.4 Hypothermie als Therapieansatz.....	80
4.5 CSA als Therapieansatz.....	82
5 Zusammenfassung	85
6 Literaturverzeichnis.....	86
7 Erklärung zum Eigenanteil	99
8 Danksagung.....	100

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1 Die Zellen der Netzhaut und ihre Schichtung</i>	<i>10</i>
<i>Abb. 2 Die Retinaschichten dargestellt mit der DAPI-Färbung</i>	<i>11</i>
<i>Abb. 3 Die neu entwickelte Ischämiekammer</i>	<i>28</i>
<i>Abb. 4 Immunhistochemische Färbung (GFAP) der Glutamat-behandelten Retinas</i>	<i>38</i>
<i>Abb. 5 Makroglia in den Glutamat-behandelten Retinas.....</i>	<i>39</i>
<i>Abb. 6 Immunhistochemische Färbung (CD11b) der Glutamat-behandelten Retinas</i>	<i>40</i>
<i>Abb. 7 Mikroglia in den Glutamat-behandelten Retinas.....</i>	<i>41</i>
<i>Abb. 8 Immunhistochemische Färbung (GFAP) der Ischämie-behandelten Retinas</i>	<i>43</i>
<i>Abb. 9 Immunhistochemische Färbung (GFAP) der Ischämie-behandelten Retinas</i>	<i>44</i>
<i>Abb. 10 Immunhistochemische Färbung (GFAP) der Ischämie-behandelten Retinas</i>	<i>46</i>
<i>Abb. 11 Makroglia in den Ischämie-behandelten Retinas.....</i>	<i>46</i>
<i>Abb. 12 Immunhistochemische Färbung (CD11b) der Ischämie-behandelten Retinas</i>	<i>48</i>
<i>Abb. 13 Mikroglia in den Ischämie-behandelten Retinas.....</i>	<i>49</i>
<i>Abb. 14 Immunhistochemische Färbung (GFAP) der Hypothermie-behandelten Retinas</i>	<i>51</i>
<i>Abb. 15 Makroglia in den Hypothermie-behandelten Retinas.....</i>	<i>52</i>
<i>Abb. 16 Immunhistochemische Färbung (CD11b) der Hypothermie-behandelten Retinas</i>	<i>53</i>
<i>Abb. 17 Mikroglia in den Hypothermie-behandelten Retinas.....</i>	<i>54</i>
<i>Abb. 18 Immunhistochemische Färbung (GFAP) der Glutamat- und Hypothermie-behandelten Retinas</i>	<i>55</i>
<i>Abb. 19 Makroglia in Glutamat- und Hypothermie-behandelten Retinas</i>	<i>56</i>
<i>Abb. 20 Immunhistochemische Färbung (GFAP) der Ischämie- und Hypothermie-behandelten Retinas</i>	<i>57</i>

<i>Abb. 21 Makroglia in den Ischämie- und Hypothermie-behandelten Retinas...</i>	58
<i>Abb. 22 Immunhistochemische Färbung (CD11b) der Ischämie- und Hypothermie-behandelten Retinas.</i>	59
<i>Abb. 23 Mikroglia in den Ischämie- und Hypothermie-behandelten Retinas</i>	60
<i>Abb. 24 Immunhistochemische Färbung (GFAP) der CSA-behandelten Retinas</i>	62
<i>Abb. 25 Makroglia in den CSA-behandelten Retinas.....</i>	62
<i>Abb. 26 Immunhistochemische Färbung (CD11b) der CSA-behandelten Retinas</i>	64
<i>Abb. 27 Mikroglia in den CSA-behandelten Retinas.....</i>	65
<i>Abb. 28 Immunhistochemische Färbung (GFAP) der Ischämie- und CSA-behandelten Retinas.....</i>	67
<i>Abb. 29 Makroglia in den Ischämie- und CSA-behandelten Retinas.....</i>	67
<i>Abb. 30 Immunhistochemische Färbung (CD11b) der Ischämie- und CSA-behandelten Retinas.....</i>	69
<i>Abb. 31 Mikroglia in den Ischämie- und CSA-behandelten Retinas.....</i>	69

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
BSA	Bovine serum albumin
CSA	Cyclosporin A
DAPI	4'6'-diamidino-2-phenylindole
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GCL	Ganglienzellschicht (Ganglion cell layer)
GFAP	Saures Gliafaserprotein (Glial fibrillary acidic protein)
INL	Innere Körnerschicht (Inner nuclear layer)
IPL	Innere plexiforme Schicht (Inner plexiform layer)
Min	Minuten
NFL	Nervenfaserschicht (Nerve fiber layer)
nm	Nanometer
OCT	Optische Kohärenztomografie
ONL	Äußere Körnerschicht (Outer nuclear layer)
OPL	Äußere plexiforme Schicht (Outer plexiform layer)
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1
PBS	Phosphate buffered saline
PRS	Photorezeptorsegmentschicht
RGZ	Retinale Ganglienzellen
RPE	Retinales Pigmentepithel
TA	Triamcinolonacetonid
TBS	Tris buffered saline
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
VEGF	Endothelwachstumsfaktor (Vascular Endothelial Growth Factor)
ZAV	Zentralarterienverschluss
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Die Gliazellen

Neben den Neuronen findet man im zentralen Nervensystem (ZNS) noch andere Arten von Zellen – die Gliazellen. Sie wurden lange Zeit als unbeteiligter Bestandteil des ZNS angesehen. Doch heute gelten sie und ihre Funktionen als sehr bedeutend für den Erhalt der Nervenzellen (de Hoz, Rojas et al. 2016).

In der Netzhaut kommen zwei verschiedene Arten von Gliazellen vor. Diese sind zum einen die Mikroglia und zum anderen die Makroglia, zu der die Astrozyten und Müllerzellen gehören (Bringmann, Pannicke et al. 2006).

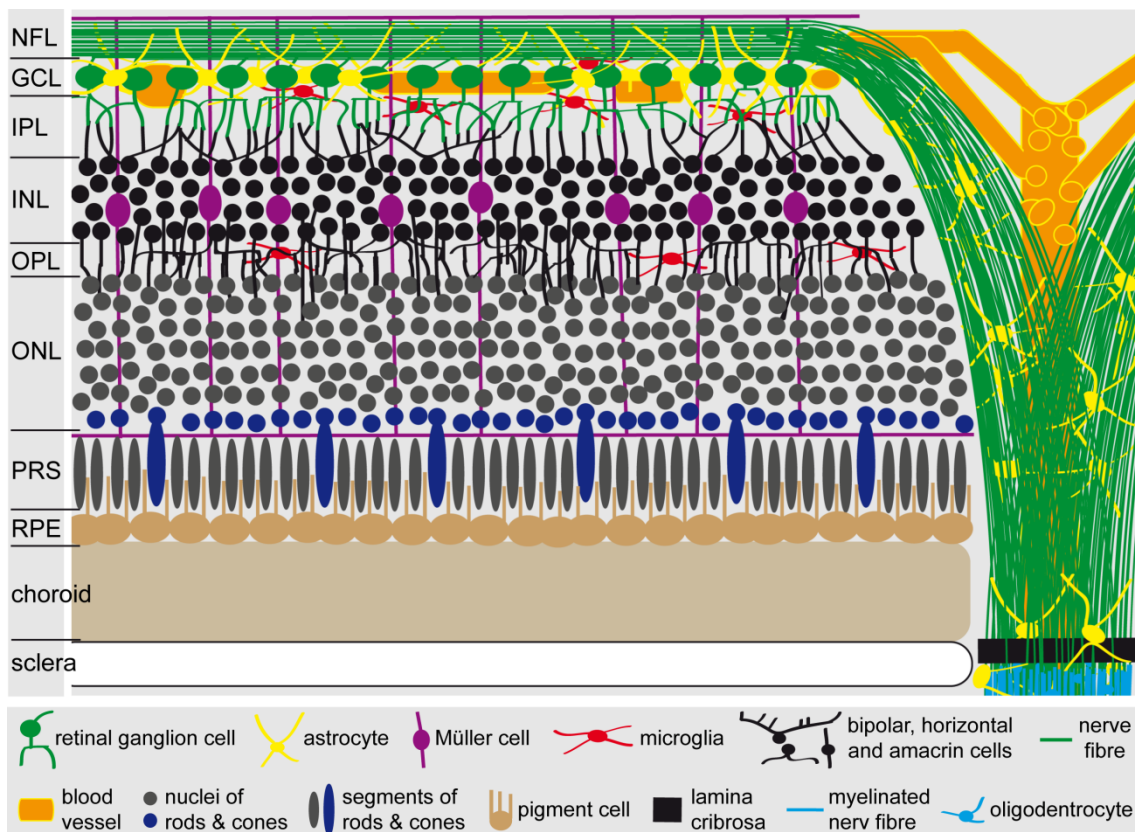


Abb. 1 Die Zellen der Netzhaut und ihre Schichtung: Es sind die Zellen der Netzhaut und die verschiedenen Netzhautschichten schematisch dargestellt. Die Netzhaut besteht von außen nach innen aus folgenden Schichten: Retinales Pigmentepithel (RPE), Schicht der inneren und äußeren Photorezeptorsegmente (PRS) der Stäbchen und Zapfen, äußere Körnerschicht (ONL) mit den Somata der Photorezeptorzellen, äußere plexiforme Schicht (OPL), innere Körnerschicht (INL) mit den Zellkörpern der amakrinen Zellen, Bipolarzellen und Horizontalzellen, innere plexiforme Schicht (IPL), Ganglienzellschicht (GCL) mit den Ganglienzellen und Nervenfaserschicht (NFL). Die

Müllerzellen erstrecken sich durch die gesamte neurale Netzhaut. Ihre Zellkörper liegen in der inneren Körnerschicht. Astrozyten befinden sich in der Nähe der Blutgefäße. Die Mikrogliazellen sind überwiegend im inneren Teil der Netzhaut in der Nähe von Ganglienzellen und Kapillaren und in der inneren plexiformen Schicht zu finden (Schnichels 2010).

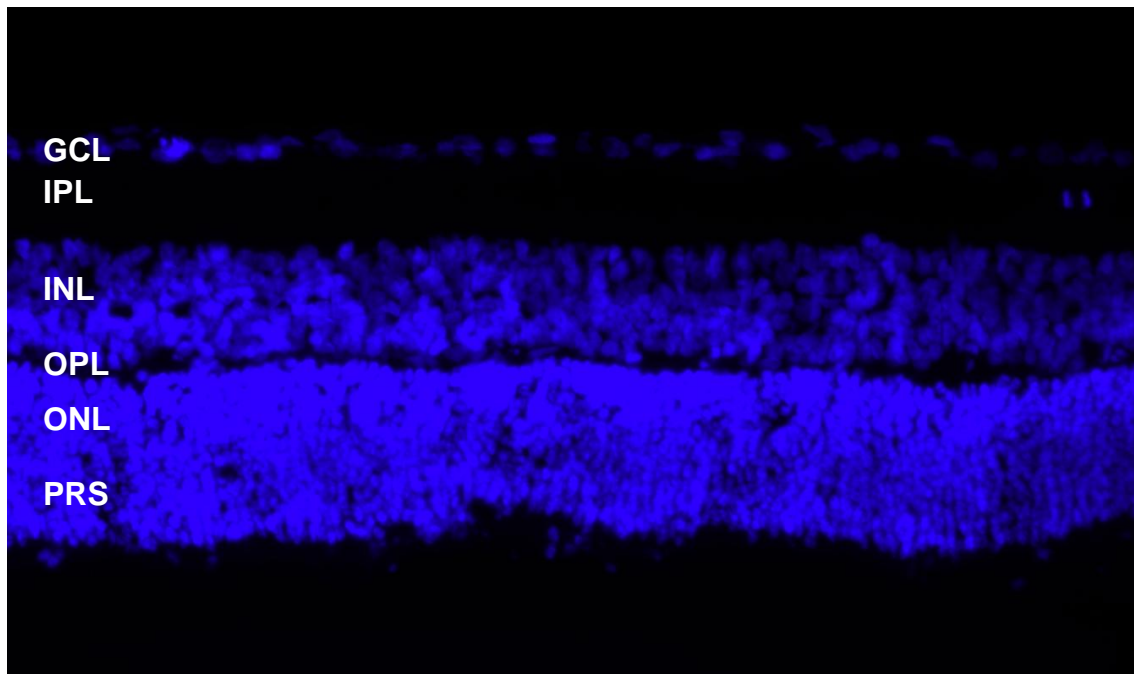


Abb. 2 Die Retinaschichten dargestellt mit der DAPI-Färbung: Es sind die Zellkerne aller Zellen der Retina dargestellt (DAPI-Färbung) (200-fache Vergrößerung). Zu erkennen sind die verschiedenen Schichten der Netzhaut von innen nach außen: GCL, IPL, INL, OPL, ONL und PRS.

1.1.1 Die Makroglia

Die Müllerzellen sind die spezialisierten und häufigsten Gliazellen der Netzhaut von Wirbeltieren. Sie erstrecken sich durch die gesamte Breite der Netzhaut, wodurch sie Kontakt zu allen Neuronen haben und bei neuronalen Vorgängen mitwirken. Dadurch kommt ihnen eine wichtige Rolle im Hinblick auf die Struktur und Funktion der Netzhaut zu. Die Müllerzellen erfüllen verschiedene Aufgaben, die in anderen Bereichen des ZNS von Astrozyten, Oligodendrozyten und Ependymzellen übernommen werden (Bringmann, Pannicke et al. 2006). Zu ihren Aufgaben zählen die Bildung eines Gerüsts und somit die Aufrechterhaltung der neuroretinalen Struktur (Willbold, Berger et al. 1997), die Vernetzung und der Molekülaustausch von retinalen Neuronen mit anderen Gebieten wie zum Beispiel Blutgefäßen oder dem Glaskörper (Bringmann, Pannicke et al. 2006) und die Aufnahme und das Recycling von Neurotransmittern, wodurch sie an der neuronalen Signalübertragung beteiligt sind (Matsui, Hosoi et al. 1999). Außerdem sind sie am retinalen Glucosestoffwechsel (Poitry-Yamate, Poitry et al. 1995), an der Regulation des Blutflusses (Paulson and Newman 1987) und der Blut-Retina-Schranke (Tout, Chan-Ling et al. 1993), am Ion- und Wasserhaushalt sowie dem pH-Wert (Newman 1996, Newman and Reichenbach 1996, Bringmann, Reichenbach et al. 2004), an der Beeinflussung der Erregbarkeit der Neuronen (Newman and Zahs 1998) und am Recycling von Photopigmenten beteiligt (Bunt-Milam and Saari 1983). Eine weitere wichtige Aufgabe, die die Müllerzellen inne haben, ist die Lichtleiterfunktion. Sie leiten das Licht von der innersten Retinaschicht in die äußeren Schichten bis zu den Photorezeptoren, wo die Umwandlung in elektrische Reize stattfindet (Reichenbach and Bringmann 2013).

Als einzigen Zellen der Netzhaut, die das Enzym Glutaminsynthetase besitzen, kommt den Müllerzellen eine entscheidende Rolle beim Neurotransmitterrecycling zu. Sie nehmen den Transmitter Glutamat auf und verwandeln es zu Glutamin, welches dann den Nervenzellen wieder zur Verfügung gestellt wird, um erneut Glutamat daraus zu bilden (Mizutani, Gerhardinger et al. 1998).

Ein Absterben der Müllerzellen würde nicht nur eine Dysplasie und Degeneration der Netzhaut nach sich ziehen sondern auch zur Apoptose von Photorezeptoren und zur Proliferation des retinalen Pigmentepithels führen (Dubois-Dauphin, Poitry-Yamate et al. 1999). Somit bestehen nicht nur Auswirkungen von pathologischen Veränderungen der Nervenzellen auf die Müllerzellen sondern auch umgekehrt. Allerdings reagieren Gliazellen weniger empfindlich auf äußere Einflüsse und Verletzungen wie z.B. Ischämie, Sauerstoffmangel oder Unterzuckerung als die retinalen Nervenzellen (Silver, Deas et al. 1997).

Astrozyten sind in der Netzhaut von Säugetieren in der Nervenfaserschicht und in der Ganglienzellschicht (de Hoz, Rojas et al. 2016) in der Nähe von und direkt an Blutgefäßen zu finden. Deren genaue Funktion ist noch nicht ausreichend verstanden. Die Astrozyten spielen eine Rolle bei der Entwicklung und Funktion des Gefäßsystems der Netzhaut und der Blut-Retina-Schranke. Es wird auch eine Beteiligung an der Vasodilatation und -konstruktion, also am Blutfluss, vermutet. Die Astrozyten an den Venen sind für die Beseitigung von toxischen Abfallprodukten zuständig (Jammalamadaka, Suwannat et al. 2015).

1.1.2 Die Mikroglia

Frank Nissl (1899, 1904) beschrieb die Mikroglia zum ersten Mal und nannte sie „Stäbchenzellen“ (Barron 1995). Weiterführende Arbeiten von Ramon y Cajal (1928) und Rio-Hortega (1932) ergaben weitere Erkenntnisse und die Charakterisierung der Mikroglia als eine Art von Zellen, die sich von Neuronen und anderen Gliazellen unterscheiden (Karlstetter, Scholz et al. 2015). Rio-Hortega gab ihnen den Namen Mikroglia (Thanos, Moore et al. 1996). Ihr Anteil an den vorkommenden Gliazellen im ZNS beträgt circa 10% (Stollg and Jander 1999).

Die Mikrogliazellen, die man im Gehirn findet, gelten als die ortsansässigen Makrophagen des ZNS. Als Teil des zellulären Immunsystems spielen sie eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Mikroorganismen oder sonstigen exogenen schädlichen Einflüssen und bei der Reparatur und Regeneration von Gewebe. Die Mikrogliazellen des Gehirns sind denen der Netzhaut sehr ähnlich (Chen, Yang et al. 2002).

Die Mikroglia stammt von den myeloischen Zellen des blutbildenden Systems ab (Eglitis and Mezey 1997). Die Vorläuferzellen treten während der embryonalen Entwicklung vom Blut in das retinale Gewebe ein, durchwandern es mittels amöboider Bewegung, differenzieren und werden zu reifen und ruhenden Mikrogliazellen (Barron 1995, Cuadros and Navascués 1998, Chen, Yang et al. 2002).

Je nach Zeitpunkt der Einwanderung und Expression von Oberflächenantigenen unterscheidet man die verzweigten parenchymalen von peri- und paravasculären Mikroglia (Provis, Diaz et al. 1996). An der Entwicklung der Netzhaut beteiligt sich die Mikroglia durch Umbau der Extrazellulärmatrix während der Ausbildung des Neuron-Glia-Netzwerks und durch Phagozytose von abgestorbenen Nervenzellen. Wenn die Entwicklung abgeschlossen ist, gehen die aktiven Phagozyten in einen Ruhezustand über. Mit ihren Ausläufern und Rezeptoren überwachen sie auch im Ruhezustand die Umgebung auf Hinweise einer ablaufenden Immunreaktion und auf Antigene (Langmann 2007). Die Mikroglia unterscheidet sich von anderen Gewebsmakrophagen nicht nur durch ihre charakteristische verästelte Gestalt sondern auch durch ihre ausgeprägte Fähigkeit zu proliferieren (Langmann 2007).

In der Netzhaut sind die Mikrogliazellen überwiegend im inneren Teil zu finden und dort vor allem in der Nähe von Ganglienzellen und Kapillaren und in der inneren plexiformen Schicht (Kohno, Inomata et al. 1982). Sie bilden ein streng organisiertes Netzwerk ohne Überlappungen, so dass jede Mikrogliazelle ihren eigenen Bereich überwacht. Durch ständige Bewegung der Ausläufer kann sie die Oberfläche von Neuronen der Netzhaut abtasten und mittels Oberflächenproteine wie z.B. Rezeptoren für Zytokine oder Antikörper ihre Umgebung wahrnehmen. In der gesunden Netzhaut wird die hochsensible Mikroglia von mehreren Mechanismen gehemmt und kontrolliert (Karlstetter, Scholz et al. 2015). Die ruhende Mikroglia kann bei Schädigung der Netzhaut dann wieder aktiviert werden, Antigene präsentieren und Zelltrümmer phagozytieren (Chen, Yang et al. 2002).

1.2 Die Gliose

1.2.1 Die Müllerzellgliose

Bei Verletzungen der Netzhaut und bei allen pathogenen Einflüssen auf diese reagieren die Gliazellen, vor allem die Müllerzellen, mit einer reaktiven Gliose (Bringmann and Reichenbach 2001). Es kann zwischen unspezifischen Reaktionen, die unabhängig von der Art des pathogenen Stimulus auftreten, und spezifischen Reaktionen, die je nach Art der Verletzung spezifisch sind, unterschieden werden. Zu den wichtigsten unspezifischen Reaktionen gehört zum einen, dass die Müllerzellen hypertrophieren und proliferieren, und zum anderen, dass sie verstärkt Intermediärfilamente wie Vimentin und das saure Gliafaserprotein (glial acidic fibrillary protein, GFAP) exprimieren. Normalerweise ist GFAP nur im Zytoplasma von Astrozyten aber nicht von Müllerzellen zu finden. Deshalb gilt der Nachweis von GFAP in Müllerzellen als zuverlässiger und frühzeitiger Indikator für Schädigungen der Netzhaut (Dahl 1979, Eisenfeld, Bunt-Milam et al. 1984, Schnitzer 1988, Okada, Matsumura et al. 1990, Osborne, Block et al. 1991).

Die reaktive Gliose kann sich positiv aber auch negativ auf die neuronalen Abbauprozesse und die Fähigkeit der neuronalen Reparatur und Regeneration auswirken. Während eine lang andauernde unkontrollierte Proliferation von Gliazellen, eine massive Gliose, der Netzhaut zusätzlich schadet (Bringmann, Francke et al. 2000), kann eine „konservative“ Gliose, die kurz nach der Schädigung eintritt und bei der die Müllerzellen nur vorübergehend proliferieren, die retinalen Nervenzellen, z.B. durch Freisetzung von neurotrophen Faktoren und Antioxidantien, vor weiterer Schädigung schützen und positive Effekte bezüglich der neuronalen Regeneration zeigen (Schütte and Werner 1998, Frasson, Picaud et al. 1999, Fischer and Reh 2001).

Die Müllerzellgliose beinhaltet eine De-Differenzierung der Müllerzellen. Die Folge ist eine veränderte bzw. eingeschränkte Funktion der Müllerzellen und damit ein behindertes Zusammenspiel von Neuronen und Gliazellen. Die unzureichende Transmitterwiederaufnahme und die verminderte Kalium-Permeabilität der Müllerzellmembran, die zu einem gestörten Ion- und Wasserhaushalt führt, sind Beispiele für Auswirkungen der De-Differenzierung, die un-

weigerlich den Nervenzelltod zur Folge haben (Bringmann, Pannicke et al. 2006). Des Weiteren proliferieren die Gliazellen (Dyer and Cepko 2000), füllen jeglichen Raum aus, der durch das Absterben der Nervenzellen entstanden ist und bilden eine Glianarbe, welche eine neuronale Regeneration erschwert bzw. unmöglich macht (Fawcett and Asher 1999, Bringmann and Reichenbach 2001). Warum sich die Müllerzellgliose in einer verstärkten Expression von Intermediärfilamenten wie GFAP äußert und welche Funktion diese hat, ist nicht bekannt. Es wird vermutet, dass die Intermediärfilamentexpression eine Rolle bei der Müllerzellhypertrophie (Lewis and Fisher 2003) und der Zellteilung spielt (Dyer and Cepko 2000).

1.2.2 Die Mikrogliose

Neben der Müllerzellgliose, die nur einen Teil der Reaktionen auf pathogene Einflüsse darstellt, laufen noch andere Prozesse ab. Die Blut-Retina-Schranke bricht zusammen, Makrophagen und Lymphozyten immigrieren in das retinale Gewebe und Mikroglia wird aktiviert (Bringmann and Reichenbach 2001).

Die schnelle Aktivierung der Mikroglia bei pathologischen Veränderungen im Gehirn spielt eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Mikroorganismen, Verletzungen des ZNS, Ischämie und Neurodegeneration (Kreutzberg 1996). Auch in der Netzhaut ist die frühe Aktivierung der Mikroglia eine Antwort auf verschiedene pathologische Ereignisse wie Infektionen, Nervenzellschädigung, Ischämie und Retinopathien, die mit einer Neurodegeneration einher gehen. Die Mikroglia der Netzhaut fungiert also wie im ZNS als Sensor für Störungen in ihrer Umgebung, dem Nervengewebe (Langmann 2007). Durch welche Signale und wie genau die Mikroglia aktiviert wird, ist noch größtenteils unbekannt (Streit, Walter et al. 1999). Sie werden wahrscheinlich von geschädigten Neuronen gesendet (Streit 2000).

Eine Aktivierung bedeutet gleichzeitig, dass Mikroglia proliferieren und zum Ort der Schädigung wandern. Es finden Veränderungen bezüglich ihrer Morphologie und Funktion statt (Kreutzberg 1996). Ihre verzweigte Gestalt geht in eine amöboide über (Karlstetter, Ebert et al. 2010). Die Phagozytose wird gestartet und Stoffe wie Cytokine, Chemokine und Neurotoxine werden ausgeschüttet

sowie bestimmte Oberflächenmarker exprimiert (Langmann 2007). Es werden eine Vielzahl von Rezeptoren gebildet, darunter auch der Komplement Rezeptor 3 (Mertsch, Hanisch et al. 2001, Schuetz and Thanos 2004). Die Ausbildung von Rezeptoren und die Sekretion von Substanzen dienen der Erkennung von abgestorbenen oder geschädigten Nervenzellen (Schuetz and Thanos 2004). Die Mikroglia trägt zum Schutz von Nervenzellen bei (Langmann 2007) und beseitigt Zell- und Gewebstrümmer. Sie hilft somit bei der Regeneration des Gewebes und der Wiederherstellung der Gewebshomeostase (Kreutzberg 1996). Allerdings kann die Stimulation von Mikroglia außer Kontrolle geraten und in eine Überaktivierung übergehen, welche den Nervenzellen schadet (Langmann 2007). Die Mikroglia ist also einerseits wichtig für die Integrität der Netzhaut, wirkt aber andererseits bei Reaktivierung neurotoxisch und löst selbstzerstörerische Prozesse in der geschädigten Netzhaut aus (Karlstetter, Scholz et al. 2015).

1.3 Die Gliazellen in der erkrankten Retina

1.3.1 Diabetische Retinopathie

Die diabetische Retinopathie ist eine Komplikation des *Diabetes mellitus*, die schon kurz nach Erkrankung an Diabetes beginnen kann. Sie führt zum Sehverlust bis hin zur Erblindung. Viele Forschungen konzentrierten sich auf die Veränderungen der Blutgefäße der Netzhaut, die allein für die Neurodegeneration und den daraus folgenden Sehverlust verantwortlich gemacht wurden. Typische klinische Zeichen der diabetischen Retinopathie sind Mikroaneurismen, Blutungen innerhalb der Netzhaut, Ödeme und Gefäßneubildungen (Lieth, Gardner et al. 2000). Verschiedene Studien belegten jedoch die verminderte Aktivität der retinalen Nervenzellen sehr bald nach Erkrankung an Diabetes noch bevor Veränderungen der Netzhaut klinisch sichtbar waren (Prager, Garcia et al. 1990, Lieth, Gardner et al. 2000). Deshalb wirken sich frühe funktionelle und pathologische Veränderungen der Neuronen oder Gliazellen vermutlich auf die Blutgefäße aus (Lieth, Gardner et al. 2000). Da die Müllerzellen unter anderem den Blutfluss und die Permeabilität der Gefäßmembran beeinflussen, ist es möglich, dass sie bei der retinalen Mikroangiopathie eine Rolle spielen. Aufgrund ihrer wichtigen Funktionen führt eine funktionelle Veränderung der Müllerzellen zur Dysfunktion von Neuronen und von Blutgefäßzellen (Mizutani, Gerhardinger et al. 1998). Die Angiogenese wird überwiegend von dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) reguliert (Stone, Itin et al. 1995). Die Produktion des VEGF findet in Müllerzellen statt und wird durch Sauerstoffmangel stimuliert (Aiello, Northrup et al. 1995, Pierce, Avery et al. 1995). Eine Studie von 1997 zeigte die vermehrte Expression von VEGF, die der Gefäßneubildung voraus geht, in Netzhäuten von Menschen mit Diabetes (Amin, Frank et al. 1997).

Studien legten nicht nur eine vermehrte GFAP-Expression in Müllerzellen von diabetischen Netzhäuten dar, sondern auch eine verminderte Funktion der retinalen Gliazellen, Glutamat in Glutamin abzubauen. Die dadurch erhöhte Glutamatkonzentration führt zu neurodegenerativen Prozessen (Mizutani, Gerhardinger et al. 1998) (Lieth, Barber et al. 1998). Andere Studien belegten, dass die Mikroglia ebenfalls durch Diabetes aktiviert wird

(Rungger–Brändle, Dosso et al. 2000, ZENG, NG et al. 2000, Gardner, Antonetti et al. 2002).

1.3.2 Glaukom

Als Glaukom wird eine Gruppe von Augenerkrankungen bezeichnet, die typischerweise mit Gesichtsfeldausfällen und Schädigung des *Nervus opticus* einher gehen. Die Ursachen können sehr unterschiedlich sein. Oft ist dabei der Augeninnendruck erhöht (Lam, Kwong et al. 2003, Karlstetter, Scholz et al. 2015). Die Netzhaut zeigt Kennzeichen wie den Verlust an Dicke der Nervenfaserschicht und retinalen Ganglienzellen (Garcia-Valenzuela, Shareef et al. 1995). Eine Studie von 2000 zeigt bei Ratten mit Glaukom eine Expression von GFAP und OX-42 und somit die Aktivierung der Gliazellen (Wang, Tay et al. 2000). Auch bei menschlichen Glaukomaugen werden die retinalen Gliazellen aktiviert (Tezel, Chauhan et al. 2003). Naskar et al. erhöhte den intraokularen Druck bei Ratten und bestätigte die frühe Reaktion der Ganglienzellen und die Beteiligung der Mikroglia an der Neurodegeneration. Die sterbenden bzw. toten Ganglienzellen wurden von aktivierter Mikroglia phagozytiert (Naskar, Wissing et al. 2002). Kezic et al. beobachtete an einem Mausmodell Mikroglia mit amöboider Form, Mikroglia proliferation und Migration in das subretinale Gewebe (Kezic, Chrysostomou et al. 2013). Eine weitere Studie ergab sogar, dass mit größerem Ausmaß der Mikrogliose die Zahl der überlebenden Ganglienzellen abnahm (Liu, Li et al. 2012).

1.3.3 Traumata

Aus Traumata, wie z.B. einer Netzhautablösung, resultieren Zerstörung und Tod der Photorezeptorzellen (Lo, Woo et al. 2011). Es erfolgt eine Gliazellaktivierung innerhalb von Minuten, die auch die folgenden Stunden und Tage anhält (Francke, Faude et al. 2001, Geller, Lewis et al. 2001, Uhlmann, Bringmann et al. 2003). Müllerzellen beginnen innerhalb eines Tages zu proliferieren und vermehrt GFAP zu exprimieren (Fisher, Erickson et al. 1991, Lewis, Matsumoto et al. 1995). Sie füllen den durch sterbende Neuro-

nen/Photorezeptoren entstandenen Raum aus, breiten sich beispielsweise bei einer Netzhautablösung auf der Oberfläche der gelösten Netzhaut aus und wachsen in subretinales Gewebe ein und verursachen somit eine subretinale Fibrose (Francke, Faude et al. 2005). Die reaktive Gliose hat einen entscheidenden Einfluss auf die Fähigkeit und das Ausmaß der möglichen Regeneration. Sie stellt einen limitierenden Faktor dar in Bezug auf Wiederherstellung oder Erhalt des Sehvermögens (Bringmann, Pannicke et al. 2006). Durch die Ausbreitung ihrer Fortsätze und die Bildung von Glianarben verhindern die Müllerzellen die Regeneration (Fisher and Lewis 2003). Die Vermeidung einer Gliose könnte die Degeneration der Netzhaut vermindern und die Neuroregeneration fördern (Bringmann, Pannicke et al. 2006).

1.3.4 Ischämie

Eine Mangeldurchblutung der Netzhaut ist eine häufige Ursache für den teilweisen Visusverlust oder die vollständige Erblindung (Osborne, Casson et al. 2004). Die mit einer Ischämie einhergehende retinale Hypoxie kann auf verschiedenen Ereignissen beruhen einschließlich Zentralarterienverschluss, Venenverschluss, Komplikationen bei diabetischer Retinopathie oder Glaukom (Kaur, Foulds et al. 2008). Die Ischämie allgemein kann auch als auslösender Faktor einer reaktiven Gliose angesehen werden. Sowohl Osborne et al. beobachteten eine verstärkte GFAP Expression in Müllerzellen nach Abklemmen der Karotiden und vertebraler Arterien (Osborne, Block et al. 1991) als auch Larsen et al., der die Ischämie durch Erhöhung des intraokularen Drucks über den systolischen Blutdruck erzeugte (Larsen and Osborne 1996). Als weiteres Kennzeichen einer reaktiven Gliose wurde auch die verminderte Kaliumpermeabilität und die Veränderung der Kaliumkanäle der Müllerzellen an Ischämie modellen festgestellt (Pannicke, Uckermann et al. 2005, Pannicke, Frommherz et al. 2014).

In einer Studie vom Jahre 2000 wurde untersucht, welchen Einfluss Gliazellen auf das Überleben der Ganglienzellen infolge einer Ischämie haben. Hierbei wurde die Vermutung bestätigt, dass reaktive Gliazellen den Tumornekrosefaktor- α und Stickstoffmonoxid bilden. Diese schädlichen Substanzen fördern die

Apoptose und damit den Zelltod von Ganglienzellen (Tezel and Wax 2000). Bereits 1988 simulierte Stefansson eine Ischämie durch Verschluss zentraler retinaler Gefäße. Er beobachtete eine starke Zellproliferation und zahlreiche Mitosefiguren, welche auch in Müllerzellen zu finden waren (Stefánsson, Wilson et al. 1988). Eine weitere Auswirkung von Ischämie auf Müllerzellen ist die gestörte verminderte Aufnahme von Glutamat. Die Folge ist die vermehrte Ansammlung von neurotoxischem Glutamat im Extrazellulärraum. Dieses führt zur Reizüberflutung der Nervenzelle und infolgedessen zur Apoptose (NAPPER, PIANTA et al. 1999). Eine weitere Ursache für die extrazelluläre Überschwemmung mit Glutamat könnte die verringerte Aktivität der Glutamin-Synthetase in Folge der Ischämie sein (Osborne, Casson et al. 2004).

1.4 Therapieformen der Gliose

1.4.1 Hypothermie

Das Gehirn und das Nervensystem kann durch Hypothermie vor Ischämieschäden bewahrt werden. Die Herabsetzung der Körpertemperatur fährt den Stoffwechsel herunter, senkt die Bildung von Sauerstoffradikalen und hemmt die Freisetzung von Stickstoffmonoxid, das toxisch wirkt (Rey-Funes, Dorfman et al. 2013). Die Hypothermie wirkt also neuroprotektiv und wird als wirksame Therapiemethode bei ischämischem Hirninfarkt eingesetzt (Yenari and Hemmen 2010). Diese Wirkung beruht unter anderem auf der Beeinflussung und Veränderung der Aktivierung der Glia, deren Proteine und Phenotyps (Kim, Seo et al. 2013). Ob Hypothermie auch zur Vermeidung einer reaktiven Gliose der Netzhaut eingesetzt werden kann, wurde in einer Studie an Ratten mit perinataler Asphyxie untersucht. Während die Föten der Hypoxie ausgesetzt waren, lag die Temperatur entweder bei 37 °C (Asphyxiegruppe) oder bei 15 °C (Hypothermiegruppe). Bei der Asphyxie konnte eine signifikante Reaktion der Gefäße und Gliazellen festgestellt werden, unter anderem die erhöhte GFAP-Expression. Die Netzhäute der Hypothermiegruppe unterschieden sich in keinsten Weise von der Kontrollgruppe. Dies führte zur Schlussfolgerung, dass Hypothermie eine Gliose verhindern kann (Rey-Funes, Dorfman et al. 2013). Auch wurde speziell die Aktivierung der Mikroglia infolge von ischämischen Ereignissen im Gehirn gezeigt. Bei gleichzeitiger Hypothermie wurde keine Aktivierung von Mikroglia beobachtet, und die Gehirne nahmen keinen signifikanten neuronalen Schaden (Kumar and Evans 1997). Auch die Bildung von Cytokinen und Stickstoffmonoxid durch Mikroglia wird schon bei geringer Hypothermie verringert (Matsui, Yoshida et al. 2014).

1.4.2 Immunsuppressive Therapie

Da es sich bei der reaktiven Gliose im Prinzip um einen überschießenden Entzündungs- und Wundheilungsprozess handelt, könnten immunsuppressive Therapien Erfolg versprechend sein. Die ablaufenden Prozesse werden durch Signalkaskaden gesteuert. Die Hauptakteure sind Gliazellen und Makrophagen,

die Cytokine und Wachstumsfaktoren bilden und freisetzen (Fernandez-Bueno, Garcia-Gutierrez et al. 2013).

Ein wichtiges Signalmolekül stellt der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) dar, der nach dem Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke von migrierenden Makrophagen ausgeschüttet wird. TNF- α aktiviert vermutlich die Müllerzellen durch die Bindung an spezifische Rezeptoren. Mikrogliazellen setzen zusätzlich TNF- α frei. Die Hemmung oder Inaktivierung von TNF- α ist ein vielversprechender therapeutischer Ansatzpunkt. In einer Studie von 2013 wurde untersucht, ob Adalimumab, ein für TNF- α spezifischer Antikörper, die Ausbildung einer retinalen reaktiven Gliose vermindert. Die GFAP-Expression konnte mit diesem TNF- α -Blocker reduziert und die retinale Organisation und Müllerzellfunktion aufrecht erhalten werden. Auswirkungen auf die Mikroglia konnten nicht beobachtet werden (Fernandez-Bueno, Garcia-Gutierrez et al. 2013).

Zwei weitere Medikamente, die den TNF- α blockieren, sind Infliximab und Etanercept (Dedania and Bakri 2015). An einem ex vivo Model von Schweine-netzhäuten wurde die Wirkung von Infliximab untersucht. Es beugt retinaler Degeneration vor und reduziert die Aktivierung von Gliazellen. Die GFAP-Expression sank nach der Behandlung mit Infliximab signifikant (Martínez-Fernández de la Cámara, Olivares-González et al. 2014).

Eine weitere entzündungshemmende, immunsuppressive Medikamentengruppe stellen die Kortikosteroide dar. Sie hemmen die Prostaglandin- und Leukotrienproduktion (Dedania and Bakri 2015). Studien gaben Anlass zur Annahme, dass Triamcinolonacetonid (TA) das Zusammenbrechen der Blut-Retina-Schranke „hemmt“. McAllister et al. behandelten Schweineaugen mit retinalem Venenverschluss mit intravitrealer Gabe von TA und konnten ein signifikant niedrigeres Level des Endothelwachstumsfaktors (VEGF) und eine signifikant reduzierte GFAP-Expression in den Müllerzellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollaugen feststellen (McAllister, Vijayasekaran et al. 2009). Medikamente, die den VEGF hemmen und somit die Gefäßneubildung nach Hypoxie, werden bereits bei diabetischer Retinopathie eingesetzt. Pegaptanib, Ranibizumab, Bevacizumab und Aflibercept führten bei Patienten zu einer verbesserten Sehschärfe (Dedania and Bakri 2015).

1.4.3 Weitere Therapieansätze

In einer Studie aus dem Jahr 2009 wurde die Auswirkung von Rho-Kinase Hemmung auf das Überleben retinaler Zellen und auf die Gliareaktivität untersucht. In organotypischen Kulturen von Mausnetzhäuten wurden Zellschäden herbeigeführt. Danach wurden die Kulturen mit einem spezifischen Rho-Kinase-Inhibitor inkubiert. Die Ergebnisse zeigten, dass bei 1 μ M Rho-Kinase-Inhibitor Zellschäden signifikant reduziert wurden. Außerdem konnte eine Abnahme des GFAPs und der Anzahl an reaktiven Astrozyten, Müllerzellen und Mikroglia festgestellt werden. Ebenfalls reduziert war die Freisetzung von Cytokinen wie TNF- α (Tura, Schuettauf et al. 2009). Auch Alt et al. kamen nach ihren Versuchen mit einem Rho-Kinase-Inhibitor an einem ex vivo Model der Retina unter Hypoxie zu dem Schluss, dass der Inhibitor den Zellschaden und die Aktivierung von Gliazellen verringert und somit neuroprotektiv wirkt (Alt, Hilgers et al. 2013).

Ein weiterer Therapieansatz ist die Behandlung mit Methylenblau, ein Guanylatcyclasehemmer. Bei neugeborenen Ratten, die perinataler Asphyxie ausgesetzt waren und deren Mütter vor der Geburt mit Methylenblau behandelt wurden, konnten die Gliose und Angiogenese reduziert werden (Rey-Funes, Larrayoz et al. 2016).

Die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) ist ein Enzym, das DNA Schäden bemerkt und repariert. Außerdem vermittelt es den apoptotischen Zelltod nach Ischämie, Glutamatexcitotoxizität oder verschiedenen Entzündungsprozessen (Yu, Wang et al. 2002). Guzyk et al. konnten durch PARP-1 Hemmung die reaktive Gliose in diabetischen Rattennetzhäuten reduzieren. Die diabetischen Ratten wurden mit Nikotinamid oder 3-Aminobenzamid, beides PARP-1-Inhibitoren, behandelt. Diabetes führt zur Vermehrung und Aktivierung von PARP-1, zur reaktiven Gliose und GFAP-Expression. Nikotinamid und 3-Aminobenzamid milderten beide den Schaden an der Makroglia, die GFAP-Expression und die reaktive Gliose (Guzyk, Tykhomyrov et al. 2016).

1.5 Der Zentralarterienverschluss (ZAV)

Der ZAV wurde vor über 150 Jahren zum ersten Mal von Albrecht von Graefe beschrieben (v. Graefe 1859). Es handelt sich dabei um eine ophthalmologische Notfallsituation. Durch die unterbrochene Blutzufuhr entsteht ein ischämischer Netzhautschaden (Pielen, Junker et al. 2010). Der Patient erleidet innerhalb weniger Stunden einen irreversiblen Sehverlust und der Visus bleibt nachhaltig eingeschränkt (Beatty and Au Eong 2000). Die geschätzte Inzidenz liegt bei 0,85 auf 100 000 pro Jahr. Es handelt sich demnach um einen seltenen Vorfall (Rumelt, Dorenboim et al. 1999). Es betrifft meist Patienten zwischen 65 und 70 Jahre, wobei 90% über 40 Jahre alt sind. Mit einem Verhältnis von 2:1 sind Männer häufiger betroffen als Frauen. In 1 - 2 % der Fälle wird ein beidseitiger ZAV diagnostiziert. Patientenberichte beschreiben einen Ausfall des Gesichtsfeldes, der plötzlich, einseitig und schmerzlos auftritt. Die Visusprognose ist schlecht und es gibt keine einheitliche Therapieempfehlung (Pielen, Junker et al. 2010).

Die *Arteria carotis interna* gibt unter anderem die *Arteria ophthalmica* als Ast ab, aus welcher dann wiederum die *Arteria centralis retinae* hervorgeht. Die Zentralarterie verläuft im Sehnerv bis zur Papille, wo sie sich in einen superioren und inferioren Zweig aufteilt (Singh and Dass 1960). Sie versorgt so vor allem die inneren Schichten aller vier Quadranten der Retina. Dazu gehören auch die retinalen Ganglienzellen, die ausschließlich über die *Arteria centralis retinae* versorgt werden. Deshalb zeigt ein Verschluss dieser Arterie die ersten Auswirkungen an den Ganglienzellen. Diese sterben als erstes ab. Ohne die Ganglienzellen kann keine Reizweiterleitung stattfinden, was zur Erblindung führt (Blak 2015).

1.5.1 Ursachen und Risikofaktoren

Die Hauptursache des ZAVs ist die Embolie. Die häufigsten Emboliequellen stellen die Arteria carotis und das Herz dar. In der Karotis verursachen zu 66 % Plaqueablagerungen und zu 30 % Karotisstenosen eine Embolie der retinalen Arterien (Hayreh 2011). Im Herzen sind pathologische Veränderungen wie Herzrhythmusstörungen, Herzklappenfehler, bakterielle Endokarditiden, ein persistierendes Foramen Ovale und links Atriale Myxome Nährboden für die Entstehung von arteriosklerotischen Plaques, die zur Embolie führen können (Pielen, Junker et al. 2010). Abzugrenzen ist die Riesenzellerarteriitis, die 4,5 % der ZAVs verursacht und für die es klare Therapieindikationen gibt (Pielen, Junker et al. 2010, Hayreh 2011). Prädisponiert für einen Verschluss sind zwei Abschnitte der Arteria centralis retinae: beim Durchtritt des Gefäßes durch die Lamina cribrosa und durch die Dura mater kommt es jeweils zur Einengung des Lumens (Hayreh 2011). Als Risikofaktoren für einen ZAV gelten die allgemeinen kardiovaskulären Risikofaktoren: Arterielle Hypertonie, Rauchen, Diabetes mellitus, Hyperlipoproteinämie und Hyperurikämie (Schmidt, Hetzel et al. 2007).

1.5.2 Therapie des ZAV

Seit der Erstbeschreibung der Erkrankung im Jahre 1859 wurden einige konservative Therapien ausprobiert. Mit dem Ziel der Hyperoxygenierung des Blutes um den Sauerstoffmangel, der durch den ZAV entsteht, auszugleichen, wurden Patienten mit einem Kohlenstoffdioxid-Sauerstoff-Gemisch oder reinem Sauerstoff beatmet. Allerdings ohne Erfolg (Deutsch, Read et al. 1983). Auch die Kombination mit einer Parazentese der Augenvorderkammer hatte keine positive Auswirkung auf den Visuserhalt (Atebara, Brown et al. 1995). Andere Therapieversuche wie z.B. die Bulbusmassage, die den Embolus dislozieren sollte (Rumelt and Brown 2003), oder die Gabe von Medikamenten wie Acetazolamid (Rassam, Patel et al. 1993), Acetylsalicylsäure oder Heparin zur Verbesserung der Durchblutung brachten keinen effektiven Nutzen (Mueller, Neubauer et al. 2003).

Da eine starke Ähnlichkeit zwischen einem Schlaganfall und einem ZAV besteht (Chen, Lee et al. 2011), wurde im Rahmen der EAGLE-Studie versucht, die

kontrollierte Lysetherapie mit dem rekombinanten gewebsspezifischen Plasminogenaktivator bei ZAV anzuwenden. Auch hier konnte keine Wirksamkeit festgestellt werden (Schumacher, Schmidt et al. 2010). Der ausbleibende Erfolg könnte allerdings aus der zu späten Behandlung resultieren. Versuche mit Rhesusaffen zeigten, dass je früher die Durchblutung wiederhergestellt wurde, desto geringer war der Schaden (Hayreh, Zimmerman et al. 2004). Die Lyse als Therapie ist nur dann effektiv, wenn sie innerhalb von sechs Stunden nach dem Verschlussereignis durchgeführt wird (Hattenbach, Kuhli-Hattenbach et al. 2008, Chen, Lee et al. 2011).

Ein weiterer Therapieansatz ist die Vitreoperfusion zur Verkürzung der Ischämiezeit. Dabei wird unter lokaler Anästhesie der Glaskörper entfernt und durch eine Spüllösung aus einem mit Sauerstoff gesättigten Zellkulturmedium ersetzt, durch das die retinalen Ganglienzellen ernährt werden können (Blair, Baker et al. 1989). Mit diesem, bisher nur bei Katzen experimentell durchgeführten Vorgehen, könnte die absolute Ischämiezeit der Retina verkürzt und die Zeit bis zur Lysetherapie überbrückt werden.

1.6 Die Vorversuche

1.6.1 Entwicklung der Ischämiekammer

Da die derzeit existierenden Methoden zur Simulation eines ZAVs *in vivo* sehr teuer und zeitaufwendig sind und zudem für die Versuchstiere ein hohes Maß an Stress und Qual bedeuten, etablierte die Arbeitsgruppe Spitzer ein neues *in vitro* Modell, mit dem eine Ischämie an organotypischen Kulturen von Retinaexplantaten erzeugt werden kann (Schnichels, Blak et al. 2013). Die neu entwickelte Ischämiekammer ist eine Box aus Metall, die luftdicht verschlossen und an den Stirnseiten durch Löcher z.B. mit Stickstoff begast werden kann. Die Kammer ist groß genug, damit darin eine 6-Well Platte mit und ohne Deckel Platz findet. Im Unterschied zu anderen Organkulturversuchen werden die Retinazellen in ihrem Zellverband kultiviert (Blak 2015).



Abb. 3 Die neu entwickelte Ischämiekammer: Box aus Metall, die luftdicht verschlossen und an den Stirnseiten durch Löcher begast werden kann (Blak 2015).

1.6.2 Ergebnisse der Vorversuche

Die durch die Kammer erzeugte Ischämie erwies sich immunohistochemisch mittels OCT und Westernblot als wirksam. Die Anzahl der retinalen Ganglienzellen (RGZ) sank nach 48 Stunden auf die Hälfte. Die toxische Wirkung von 1 mM Glutamat führt zu einem vergleichbaren Zellverlust.

Es wurden zwei Therapieansätze zur Behandlung eines ZAV mit dem Modell getestet. Da die Hypothermie bei Schlaganfällen des ZNS bereits erfolgreich als Therapie eingesetzt wird, wurde untersucht, ob diese Behandlung auch eine protektive Wirkung auf RGZ hat. In den *in vitro* Versuchen wurden zwei verschiedene Temperaturen (20 °C, 30 °C) evaluiert. Beide Temperaturen ergaben einen signifikanten *rescue effect*. Bereits 30 °C haben einen positiven Effekt auf die Zahl der RGZ.

Das Medikament CSA wurde als zweite Therapie getestet. Die Versuche zeigten einen signifikanten neuroprotektiven Effekt von 9 µg/ml CSA.

Mit der neu etablierten Methode zur *in vitro* Simulation einer Ischämie an Retina-Explantaten können also neue Therapieansätze getestet und evaluiert werden (Blak 2015).

1.7 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war, die Auswirkungen einer Ischämie auf die Gliazellen der Retina zu untersuchen und zwei Therapieansätze zu testen.

Die neue Methode zur Erzeugung einer Ischämie *in vitro* mit Hilfe der Ischämiekammer ermöglicht es, einen ZAV nachzustellen und neue Therapieformen an Retinakulturen zu untersuchen. Vorangegangene Versuche zeigten bereits den protektiven Effekt von Hypothermie und Cyclosporin A. Beide Therapieansätze verminderten das Absterben der RGZ.

Die Dissertation beschäftigt sich nun mit der reaktiven Gliose, sowohl mit der Müllerzellgliose als auch mit der Mikroglia, infolge einer Ischämie. Es wurde nicht nur getestet wie sich die Gliazellen bei reiner Ischämie (45, 60, 75, 90, 120 Minuten) gegenüber den Kontrollen verhalten, sondern auch bei verschiedenen Glutamatkonzentrationen (0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM), da Glutamat bekanntlich toxisch wirkt. Zudem sollte untersucht werden, ob zwischen dem Verlust oder dem Erhalt an retinalen Ganglienzellen und der Ausbildung der Gliose in der Netzhaut eine Korrelation besteht.

Außerdem wurde untersucht, ob Hypothermie und CSA eine reaktive Gliose hemmen bzw. verhindern können und somit als Therapie in Frage kommen. Es sollte die optimale Temperatur über eine vierstündige Anwendung gefunden werden, sowie die optimale Konzentration des Medikaments CSA.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

- Alexa Fluor 488 Esel anti-Maus Antikörper, life technologies # REF A21202 LOT 1741782
- Alexa488 Esel anti-Hase IgG, Thermo Fisher Scientific # A-21206
- BSA (Bovine Serum Albumin), Sigma-Aldrich A7906-100G/Lot # SLBJ2586V
- DAPI
- Deckgläser 24x50 mm Greiner Bio-One
- Milli Q H₂O
- PBS, PAA Laboratories GmbH # H 15-00
- Fettstift, Dako Pen, Dako S2002
- Fluorsave Reagent, Calbiochem # 345789
- Maus anti-Ratte CD11b Antikörper, AbD Serotec # MCA275R Batch No:0113
- Methanol, AnalaR NORMAPUR # 20847.307
- Natriumchlorid, AnalaR NORMAPUR # 15H310016
- Pipettenspitzen (20 µl, 100 µl, 1000 µl), Greiner Bio-One
- Salzsäure 25%, Merck # 1.00316.1000
- Saures Gliafaserprotein (GFAP) Antikörper, Dako Cytomation # Z0334
- Trispuffer, Sigma # T1503
- Triton X-100, Roth # 3051.2
- Tween 20, Serva # 39796.01

2.2 Geräte

- Mikroskop, Axioplan 2 Imaging (Zeiss, Jena, Deutschland)
- Pipetten, Eppendorf
- Waage, Sartorius LA 120 S
- Magnetrührer IKA COMBIMAG RCT
- Feuchtkammer

2.3 Lösungen

2.3.1 TBS-Puffer (10x) (Tris buffered saline)

Zur Herstellung der TBS-Pufferlösung wurden 60,57 g Trispuffer und 87,66 g Natriumchlorid in 900 ml destilliertem Wasser aufgelöst und mit einem Magnetrührer durchmischt bis die Lösung klar war. Der pH-Wert von 7,6 wurde mit 25%iger Salzsäure eingestellt. Danach wurde die Lösung mit destilliertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Um einen Liter einer einfach konzentrierten TBS-Pufferlösung zu erhalten, wurden 100 ml der zehnfach konzentrierten Lösung zu 900 ml destilliertem Wasser gegeben.

2.3.2 TBS-Tween (0,1 %)

Zu einem Liter einfach konzentriertem TBS wurde ein Milliliter Tween 20 hinzugefügt. Die Pipettenspitze wurde hierzu abgeschnitten um das sehr visköse Tween besser pipettieren zu können.

2.3.3 10 % BSA + 0,5 % Triton X-100 in PBS

Zur Herstellung der Lösung, die zum Blocken verwendet wurde, wurden zehn Gramm BSA in 100 ml PBS aufgelöst und anschließend 500 µl Triton X-100 pipettiert. Die Pipettenspitze wurde hier ebenfalls abgeschnitten aufgrund der hohen Viskosität des Triton X-100.

2.3.4 5 % BSA in PBS

Fünf Gramm BSA wurden in 100 ml PBS gelöst.

2.4 Methoden

Die folgend beschriebenen Vorarbeiten wurden von Matthias Blak durchgeführt, der mir freundlicherweise seine übrig gebliebenen Schnitte zur Verfügung stellte. Nach dem durch CO₂ herbeigeführten Tod der Ratten fand die E nukleation und anschließende Präparation der Retinas statt. Sie wurden für 24 h, 48 h oder 72 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % rel. Feuchte im Zellkulturschrank kultiviert und wie in 2.4.1 bis 2.4.4 beschrieben behandelt. Danach erfolgte die Fixierung, Kryoeinbettung und Herstellung von Kryoschnitten.

2.4.1 Ischämie

Die Ischämie wurde mithilfe der neu entwickelten Ischämiekammer simuliert, einer Metallbox, die luftdicht verschlossen und mit Stickstoff begast werden kann.

2.4.2 Glutamat

Verschiedene Konzentrationen an Glutamat (0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM) wurden im Medium gelöst, das direkt nach der Präparation unter die Einsätze pipettiert wurde. Dort wurde es 24 h belassen und dann durch reines Medium ersetzt.

2.4.3 Hypothermie

Zur Simulation der Hypothermie wurden die Retinakulturen für 4 Stunden in eine gekühlte Umgebung gestellt (10 °C, 20 °C, 30 °C).

Bei Ischämie- und Hypothermie-Behandlung wurde die Ischämiekammer zuvor auf die gewünschte Temperatur herunter gekühlt. Die Begasung erfolgte bei der entsprechenden Temperatur.

2.4.4 CSA

Das Medium mit den verschiedenen CSA Konzentrationen (1 µg/ml, 3 µg/ml, 6 µg/ml, 9 µg/ml) wurde unter die Explantate pipettiert. So wurde es 24 h belassen und anschließend durch reines Medium ersetzt.

2.5 Färbung und Auswertung

Die Färbungen wurden von mir selbst durchgeführt.

2.5.1 Färbung mit GFAP-Antikörpern

Der verwendete GFAP-Antikörper interagiert mit dem GFAP, einem Protein, das im Zytoplasma von Gliazellen des Zentralnervensystems als Bestandteil von Intermediärfilamenten vorliegt. Deshalb eignet sich der GFAP-Antikörper zur Markierung von Gliazellen, genauer Müllerzellen und Astrozyten, in der Netzhaut. Das Verdünnungsverhältnis lag bei 1:4.000. Dementsprechend wurden zuerst 2 µl GFAP-Antikörper in 20 µl BSA in PBS (5 %) gelöst. Von dieser Mischung wurden anschließend 2 µl in 800 µl BSA in PBS (5 %) gelöst. Als Zweitantikörper wurde der grün fluoreszierende Alexa 488 Esel anti-Hase IgG verwendet. Dieser wurde 1:2.000 verdünnt, also wurden 2 µl in 4 ml BSA in PBS (5 %) pipettiert. Die Hintergrundfärbung, die durch unspezifische Bindung der GFAP-Antikörper entstehen kann, wurde durch einstündiges Blocken mit 10 % BSA plus 0,5 % Triton X-100 in PBS verringert. Zur Versuchskontrolle wurde bei jeder Färbung eine Negativkontrolle durchgeführt, indem der erste Antikörper auf einen Schnitt nicht aufgetragen wurde.

2.5.2 Färbung mit CD11b-Antikörpern

CD11b gehört zu den Differenzierungsmarkern und befindet sich als Teil des Komplement Rezeptors 3 auf der Oberfläche von Makrophagen. Der CD11b-Antikörper bindet spezifisch an die Proteinuntereinheit CD11b und kann somit zur Darstellung von Makrophagen bzw. Mikroglia in der Netzhaut verwendet werden. Das Verdünnungsverhältnis lag bei 1:500. Es wurden 2 µl CD11b-Antikörper in 1.000 µl BSA in PBS (5 %) gelöst. Von dem grün fluoreszierenden Zweitantikörper Alexa 488 Esel anti-Maus wurden 1 µl in 1.000 µl BSA in PBS (5 %) gelöst. Das entspricht einer Verdünnung von 1:1.000. Zur Minimierung der Hintergrundfärbung wurde ebenfalls eine Stunde lang mit 10 % BSA plus 0,5 % Triton X-100 in PBS geblockt. Zur Versuchskontrolle wurde bei jeder Färbung eine Negativkontrolle angefertigt.

2.5.3 DAPI (4'6'-diamidino-2-phenylindole)

DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der die Zellmembran durchdringt, sich an die im Zellkern befindliche DNA anlagert und somit die Zellkerne aller Zellen markiert. DAPI fluoresziert mit blauer Farbe bei Anregung mit ultraviolettem Licht (447 nm).

2.5.4 Färbeprotokoll (GFAP + DAPI)

Die Objektträger mit den Kryoschnitten wurden aus dem Gefrierschrank genommen und zunächst in Methanol bei Raumtemperatur für zehn Minuten fixiert und danach ebenfalls für zehn Minuten mit 1x TBS gewaschen. Die vier Retinaschnitte, die sich jeweils auf einem Objektträger befanden, wurden mit einem Fettstift umrundet um die gezielte Applikation von Flüssigkeiten auf die Schnitte zu ermöglichen. In Feuchtkammern ausgelegt wurden die Schnitte mit 10 % BSA plus 0,5 % Triton X 100 in PBS geblockt. Nach einer Stunde erfolgte das Auftragen des GFAP-Antikörpers (Erstantikörper, 1:4.000) und die Inkubation über Nacht bei 4 °C. Am darauffolgenden Morgen wurde dreimal à fünf Minuten mit TBS plus 0,1 % Tween gewaschen, danach der Zweitantikörper appliziert (Alexa 488 Esel anti-Hase) (1:2.000) und für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Objektträger wurden mit einem schwarzen Tuch abgedeckt. Nach erneutem dreimaligen Waschen à fünf Minuten mit TBS plus 0,1 % Tween wurde für fünf Minuten bei Raumtemperatur mit DAPI (1 µg/ml in PBS) gefärbt. Abschließend wurde nochmals zweimal je fünf Minuten mit TBS plus 0,1 % Tween und einmal für fünf Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Dem kurzen Lufttrocknen der Objektträger folgte das Eindecken mit Fluorsafe und Deckgläsern.

2.5.5 Färbeprotokoll (CD11b + DAPI)

Die Färbung mit den CD11b-Antikörpern entspricht der GFAP-Färbung wie unter 2.4.4 beschrieben. Als Erstantikörper wurde der CD11b-Antikörper (1:500) aufgetragen, als Zweitantikörper der Alexa 488 Esel anti-Maus (1:1.000). Der Zweitantikörper wurde für zwei Stunden inkubiert.

2.5.6 Fotos und Auswertung

Die gefärbten Schnitte wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 Imaging (Zeiss, Jena, Deutschland) betrachtet. Für die DAPI Färbung wurde ein Schmalbandfilter mit einer Wellenlänge von 447 nm verwendet, für die GFAP- sowie die CD11b-Färbung der FITC Schmalbandfilter mit einer Wellenlänge von 524 nm. Von jeder Netzhaut wurden zehn Fotos bei 200-facher Vergrößerung mit dem Programm Open lab (Version 5.1.1) aufgenommen. Die Auswertung beider Färbungen (GFAP und CD11b) erfolgte mittels dem Programm ImageJ (Version 1.51a, <https://imagej.net/Downloads>) mit dem Makro „GFAP Analyse Version 1.3“ der Ruhr-Universität Bochum, mit dem die angefärbte Fläche (TotalArea) in Pixel² ermittelt wurde. Dieser Wert wurde ins Verhältnis zur Fläche der gesamten Retina auf dem Bild gesetzt. Der Ergebniswert gibt somit den Anteil an grün gefärbter Fläche in Prozent in Bezug auf die Gesamtfläche der Retina auf dem Bild an. Aus den zehn Fotos eines Schnittes wurde der Mittelwert gebildet und aus den Mittelwerten eines Auges wiederum der Mittelwert.

2.6 Statistische Auswertung

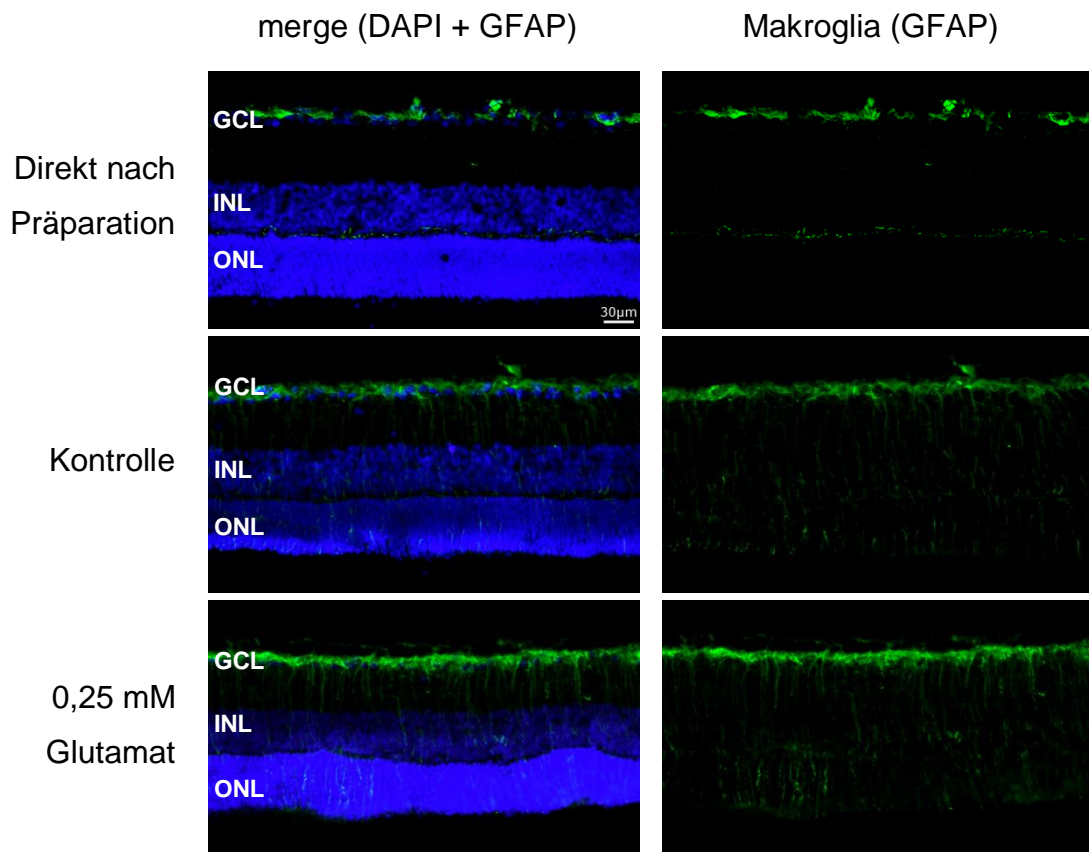
Zur statistischen Auswertung wurde die Software JMP® (Version 11.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) verwendet. Die Versuche wurden mit ANOVA analysiert und mittels Tukey-Kramer ausgewertet. Die Ergebnisse wurden als signifikant angesehen bei $p < 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Glutamatstress

Für die Glutamatversuche wurden vier unterschiedliche Konzentrationen von Glutamat im Medium verwendet (0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM). Die Zellen wurden die ersten 24 Stunden in dem jeweiligen Medium kultiviert. Dann wurde es durch Medium ohne Glutamat ausgetauscht. Der Versuch wurde nach 48 Stunden beendet. Danach erfolgte die Fixierung, Kryoeinbettung und Herstellung von Kryoschnitten. Anschließend wurden die Schnitte eingefroren und später wie in 2.5.4 beschrieben gefärbt.

3.1.1 Makrogliareaktion nach Glutamatstress



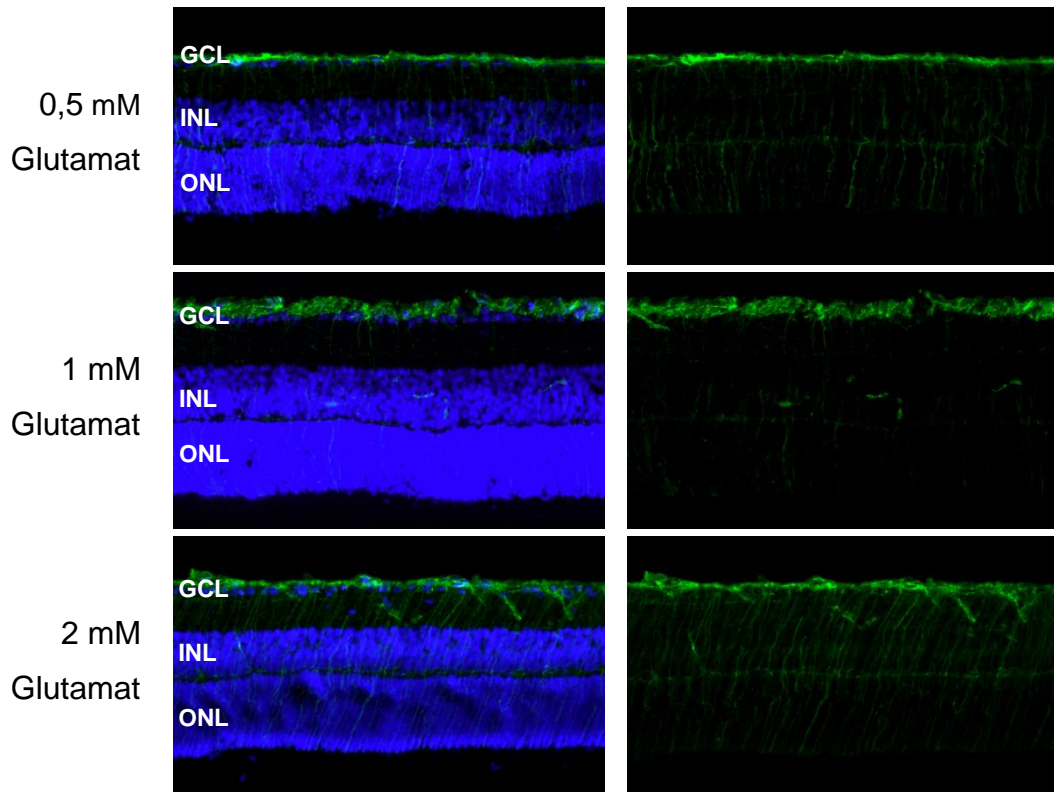


Abb. 4 Immunhistochemische Färbung (GFAP) der Glutamat-behandelten Retinas: Repräsentative Färbung der Retinas, die 48 h kultiviert (außer Retinas direkt nach Präparation) und mit Glutamat in verschiedenen Konzentrationen behandelt wurden (0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM). Auf den Fotos ist ein Querschnitt der Retina in 200-facher Vergrößerung dargestellt. Rechts die Makroglia mithilfe des GFAP-Antikörpers markiert, links ein *merge* aus DAPI (alle Zellkerne) und GFAP-Färbung.

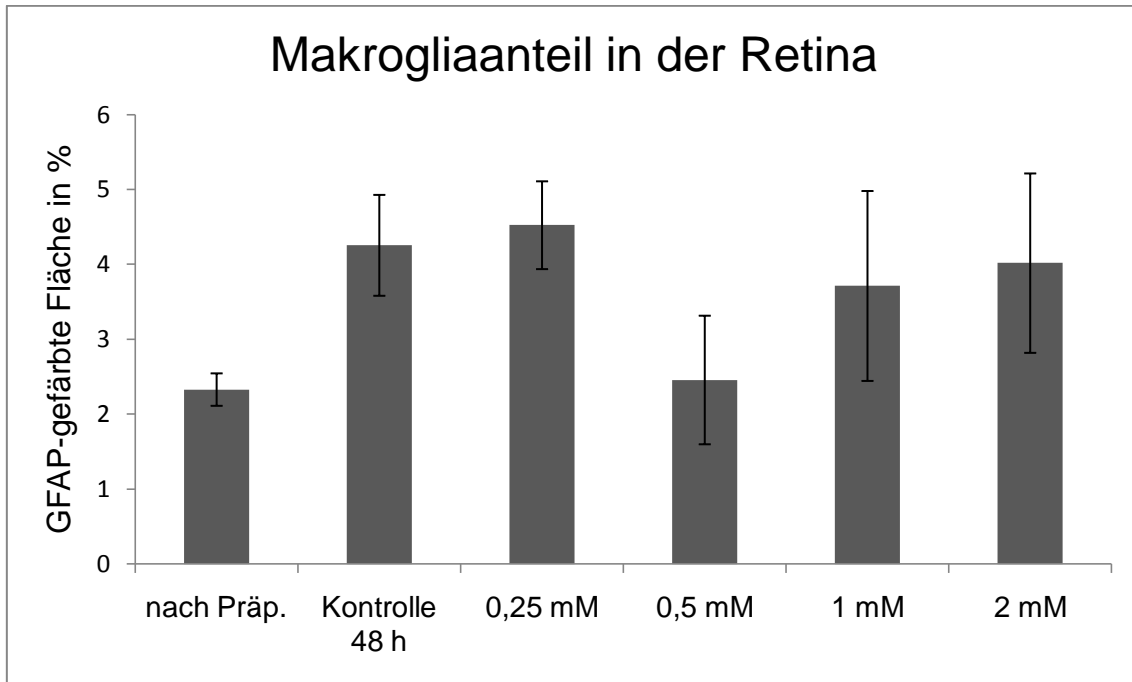


Abb. 5 Makroglia in den Glutamat-behandelten Retinas: Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil der gefärbten Fläche an der Gesamtfläche der Retina. Die angefärbte Fläche der Retinas unmittelbar nach Präparation und bei einer Glutamatkonzentration von 0,5 mM beträgt ca. 2,5 %. Bei der Kontrolle nach 48 h und den anderen Glutamatkonzentrationen liegt sie etwas höher bei 3,5 bis 4,5 %. Keine der Glutamatkonzentrationen führt zu einer signifikanten Makrogliaaktivierung. Die Balken und Fehlerindikatoren geben Mittelwerte und Standardfehler an.

Sowohl bei den Kontrollen als auch bei den verschiedenen Glutamatkonzentrationen liegt der Makrogliaanteil über dem der Retinas, die direkt nach Präparation eingefroren wurden (2,33 %). Bei einer Konzentration von 0,25 mM Glutamat steigt der Wert mit 4,52 % leicht über den der Kontrollen (4,25 %). Der Makrogliaanteil der anderen Konzentrationen ist geringer als der der Kontrollen. Bei einer Konzentration von 0,5 mM Glutamat liegt er bei 2,46 %, bei 1 mM Glutamat bei 3,7 % und bei 2 mM Glutamat bei 4,02 %. Insgesamt gibt es keine signifikanten Unterschiede.

3.1.2 Mikrogliareaktion nach Glutamatstress

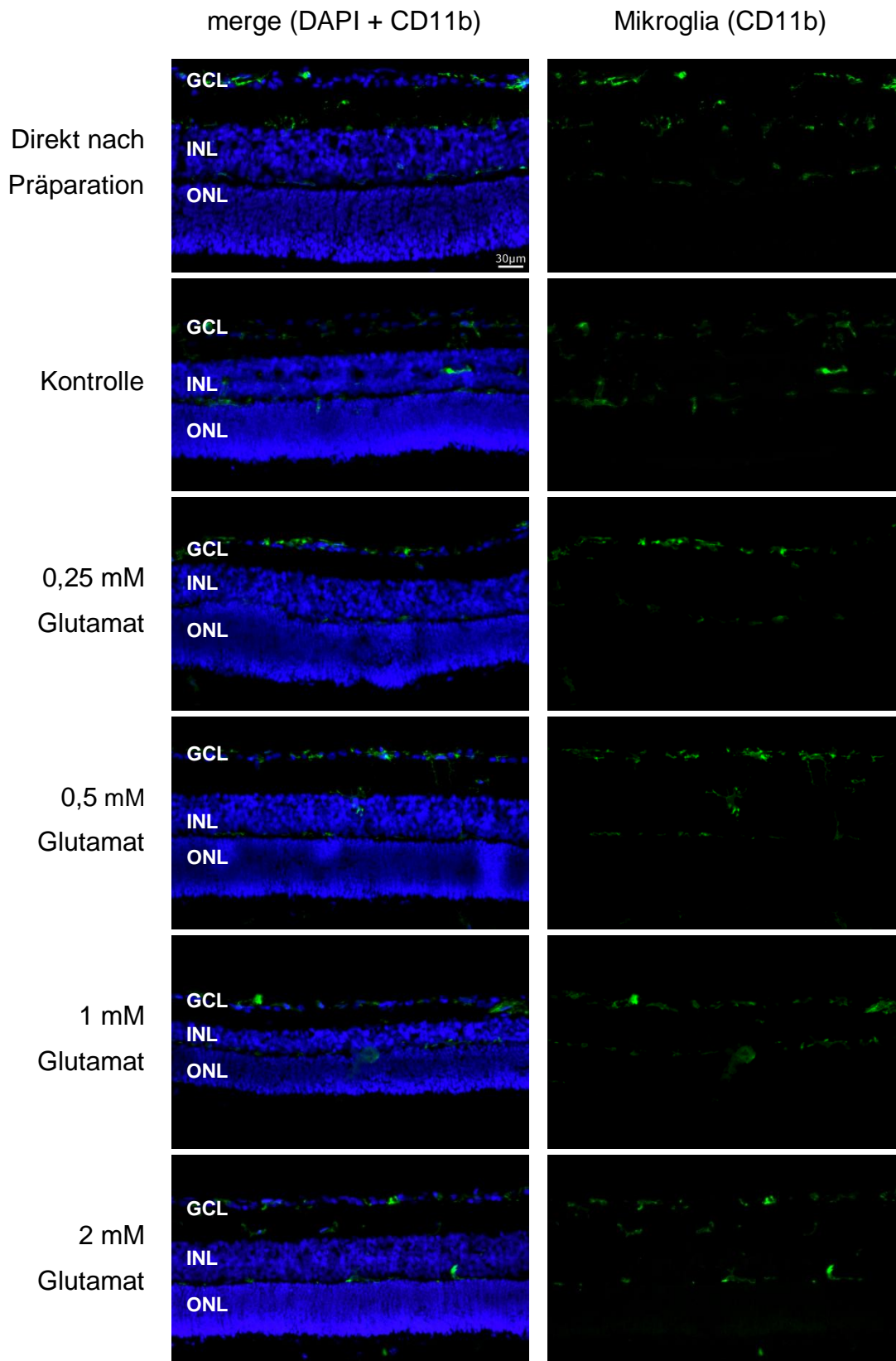


Abb. 6 Immunhistochemische Färbung (CD11b) der Glutamat-behandelten Retinas: Repräsentative Färbung der Retinas, die 48 h kultiviert (außer Retinas direkt nach

Präparation) und mit Glutamat in verschiedenen Konzentrationen behandelt wurden (0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM). Auf den Fotos ist ein Querschnitt der Retina in 200-facher Vergrößerung dargestellt. Rechts die Mikroglia mithilfe des CD11b-Antikörpers markiert, links ein *merge* aus DAPI (alle Zellkerne) und CD11b-Färbung.

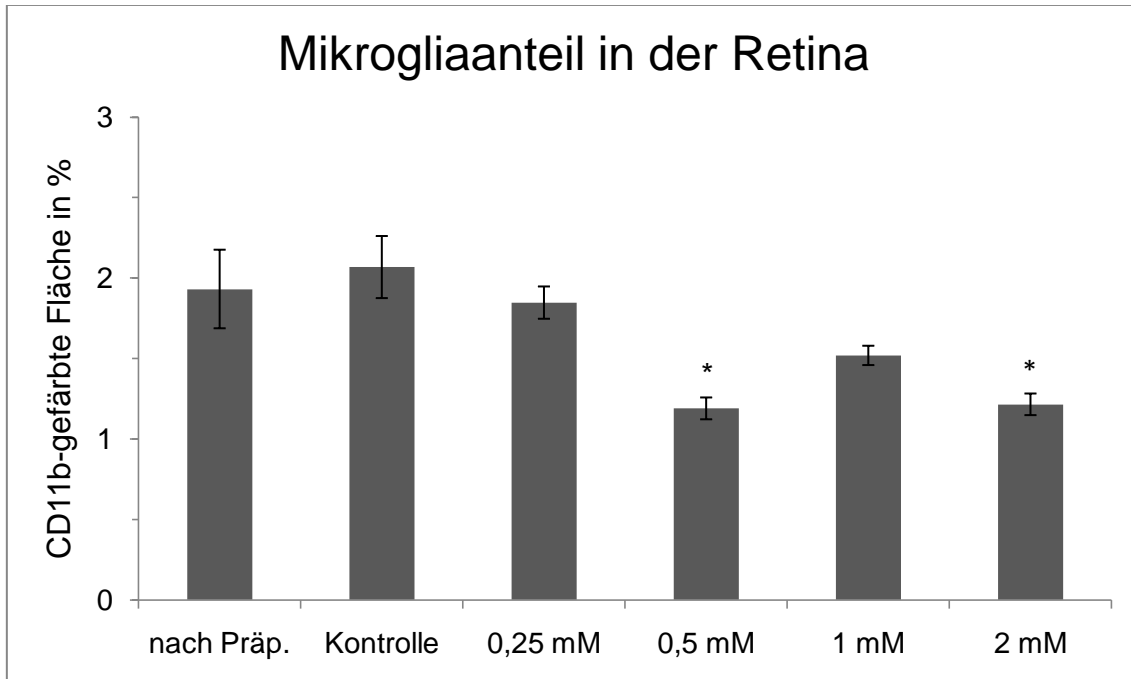


Abb. 7 Mikroglia in den Glutamat-behandelten Retinas: Dargestellt ist der prozentuale Anteil der gefärbten Fläche an der Gesamtfläche der Retina. Die Retinakulturen wurden mit verschiedenen Glutamatkonzentrationen behandelt (0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM) und nach 48 h ausgewertet. Der Anteil an Mikroglia in den Retinas ist bei allen Glutamatkonzentrationen geringer als bei den Kontrollen und den Retinas unmittelbar nach Präparation. Die statistische Signifikanz ist gekennzeichnet durch * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ gegenüber den Kontrollen. Die Balken und Fehlerindikatoren geben Mittelwerte und Standardfehler an.

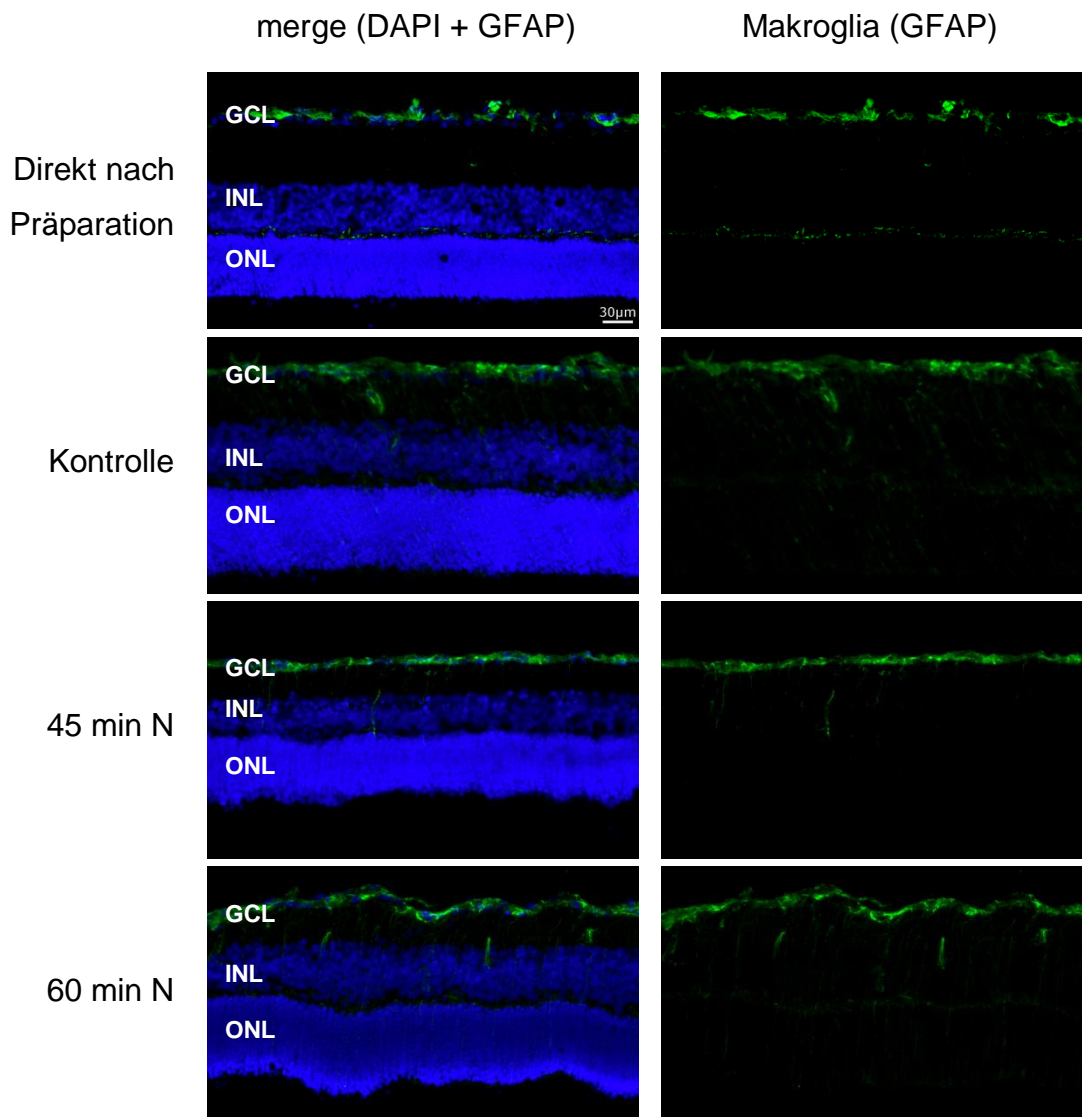
Die Aktivierung der Mikroglia blieb unbeeinflusst vom Glutamatstress. Die angefärbte Fläche der Retinas direkt nach Präparation (1,93 %) und die der Kontrollen (2,07 %) unterscheiden sich nicht voneinander. Bei einer Konzentration von 0,25 mM Glutamat liegt der Wert mit 1,84 % ebenfalls auf Höhe der Retinas direkt nach Präparation und der Kontrollen. Die Konzentrationen 0,5 mM, 1 mM und 2 mM zeigen mit ihren Werten von 1,19 %, 1,52 % und 1,21 % einen geringeren Anteil (bei 0,5 mM und 2 mM signifikant) an Mikroglia.

3.2 Ischämie

Die Ischämieversuche wurden mit der neu entwickelten Ischämiekammer durchgeführt. Die Retinaexplantate wurden unterschiedlich lange mit Stickstoff begast: 45, 60, 75, 90 und 120 Minuten. Die Versuche wurden nach 24, 48 oder 72 Stunden beendet. Die Retinas wurden wie in 3.1 beschrieben weiterbehandelt.

3.2.1 Makrogliareaktion nach Ischämie

Auswertung nach 24 Stunden:



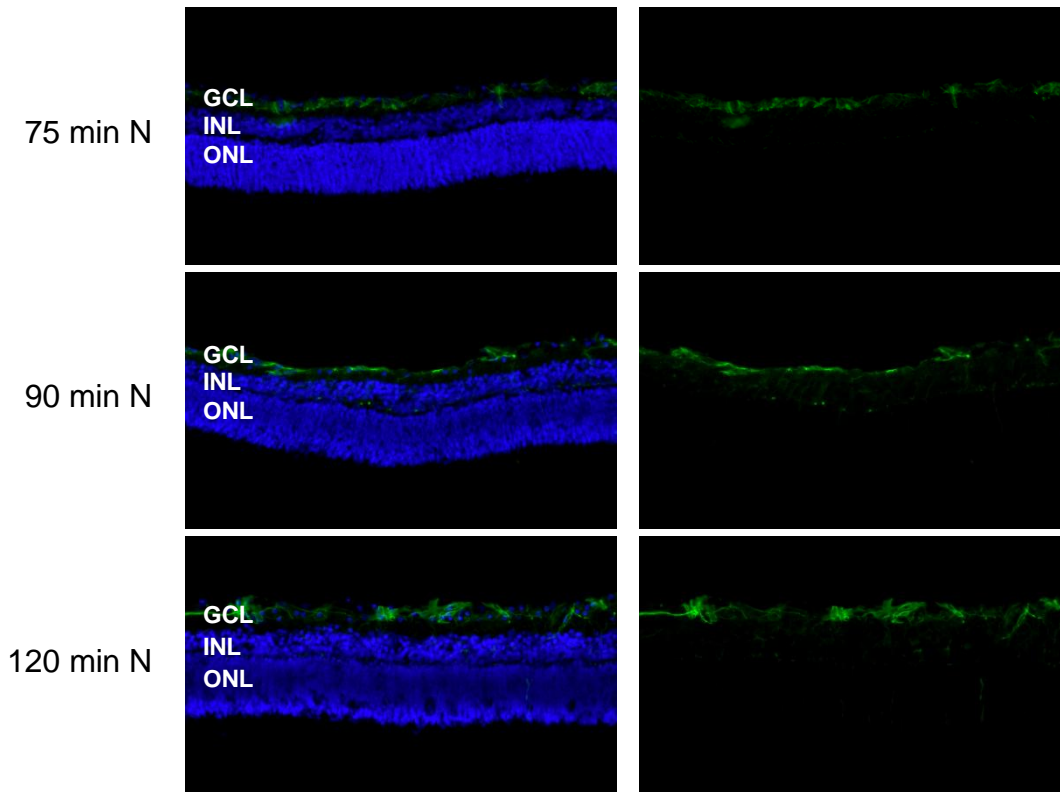
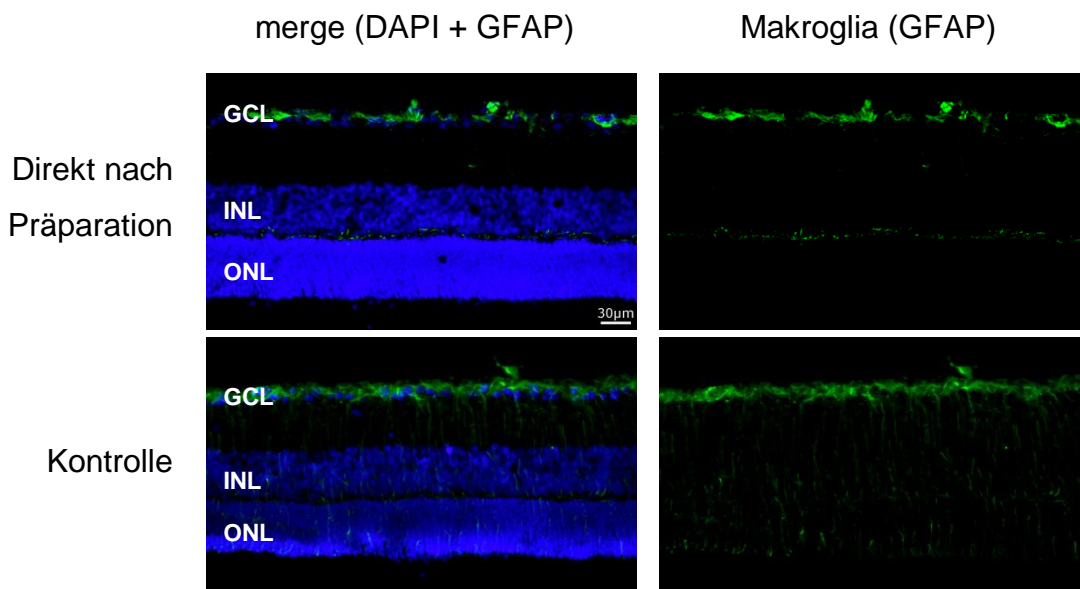


Abb. 8 Immunhistochemische Färbung (GFAP) der Ischämie-behandelten Retinas: Repräsentative Färbung der Retinas, die 24 h kultiviert (außer Retinas direkt nach Präparation) und unterschiedlich lang Ischämie-behandelt wurden (45 min, 60 min, 75 min, 90 min, 120 min). Auf den Fotos ist ein Querschnitt der Retina in 200-facher Vergrößerung dargestellt. Rechts die Makroglia mithilfe des GFAP-Antikörpers markiert, links ein *merge* aus DAPI (alle Zellkerne) und GFAP-Färbung.

Auswertung nach 48 Stunden:



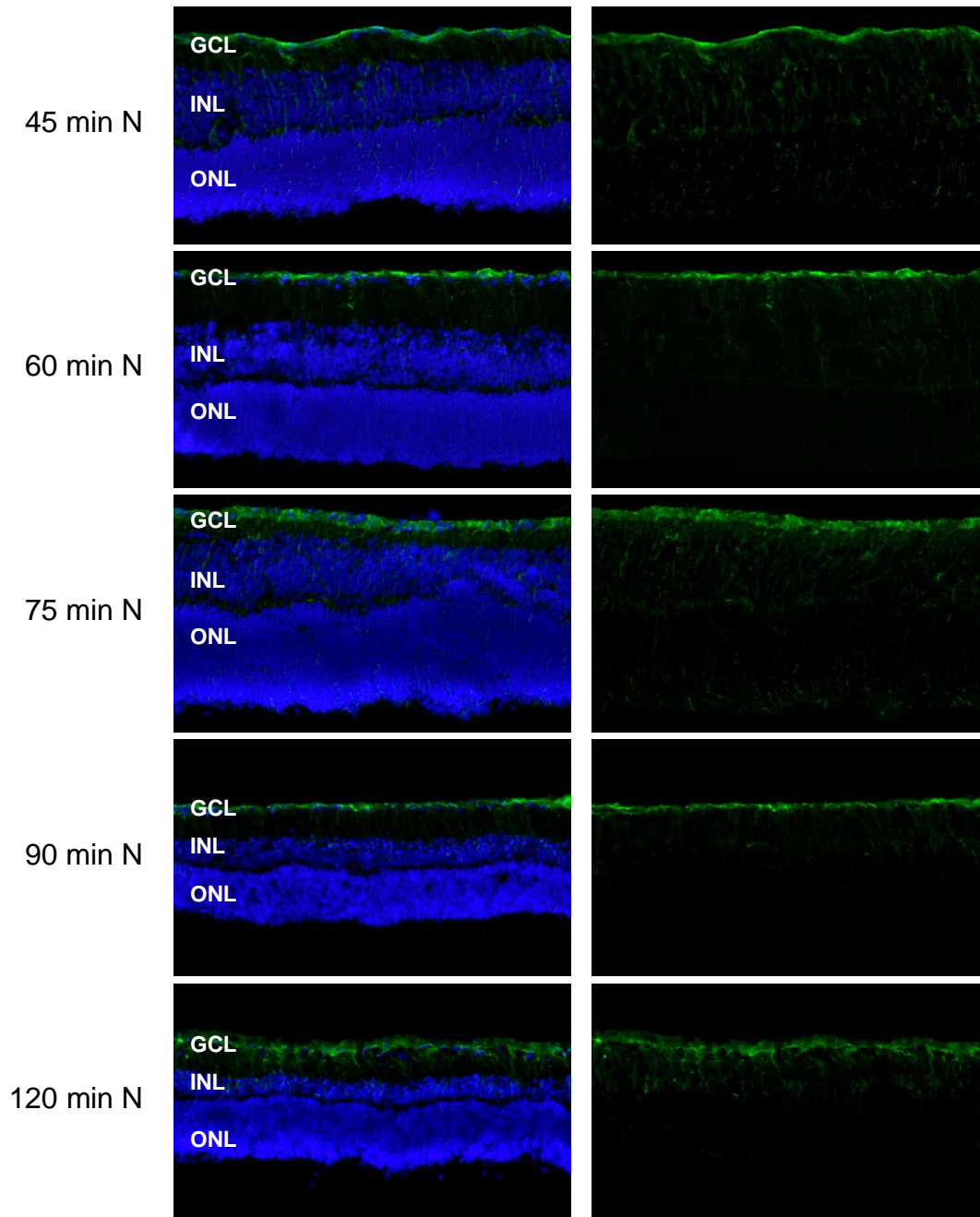
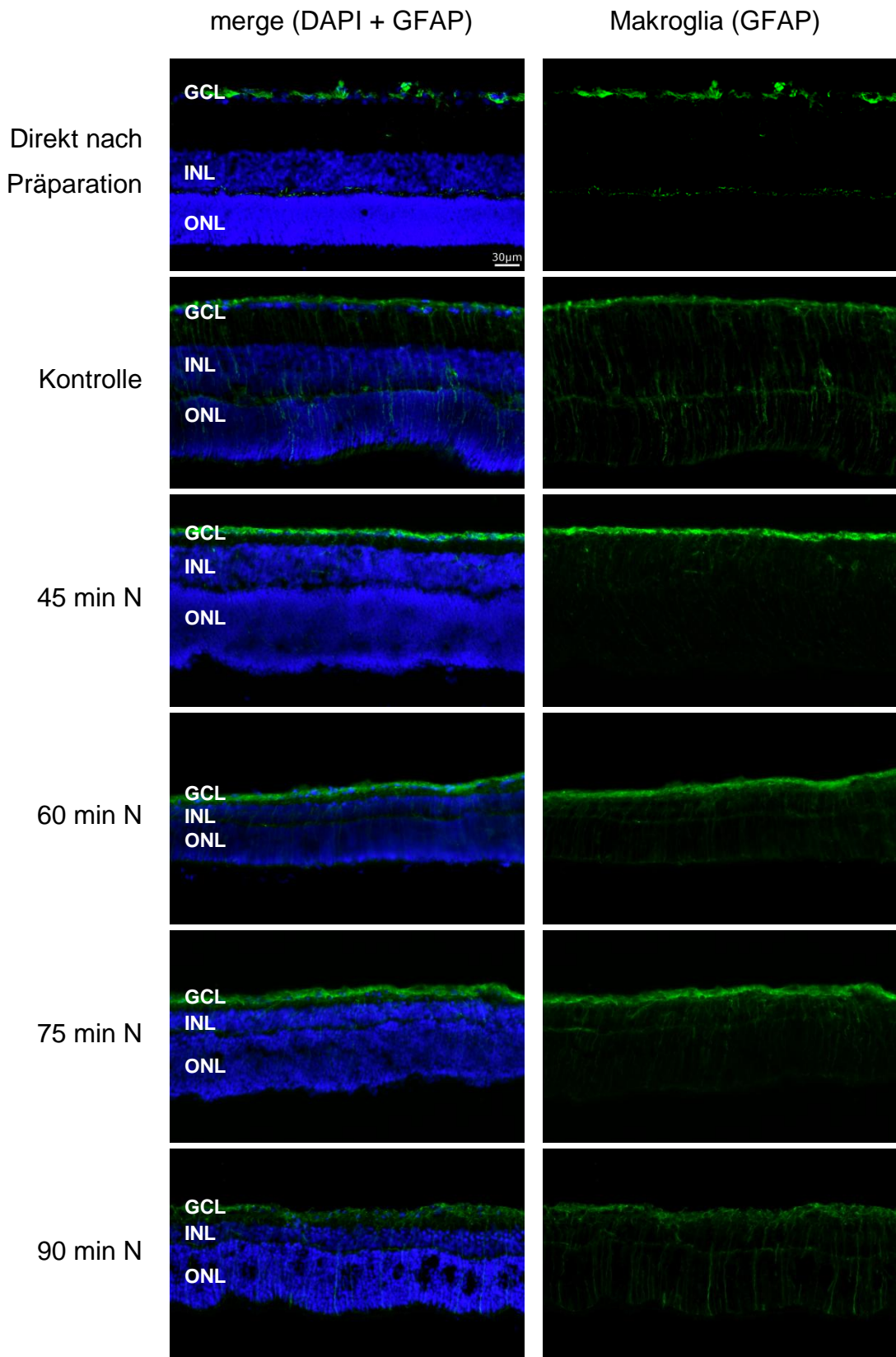


Abb. 9 Immunhistochemische Färbung (GFAP) der Ischämie-behandelten Retinas: Repräsentative Färbung der Retinas, die 48 h kultiviert (außer Retinas direkt nach Präparation) und unterschiedlich lang Ischämie-behandelt wurden (45, 60, 75, 90, 120 Minuten). Auf den Fotos ist ein Querschnitt der Retina in 200-facher Vergrößerung dargestellt. Rechts die Makroglia mithilfe des GFAP-Antikörpers markiert, links ein merge aus DAPI (alle Zellkerne) und GFAP-Färbung.

Auswertung nach 72 Stunden:



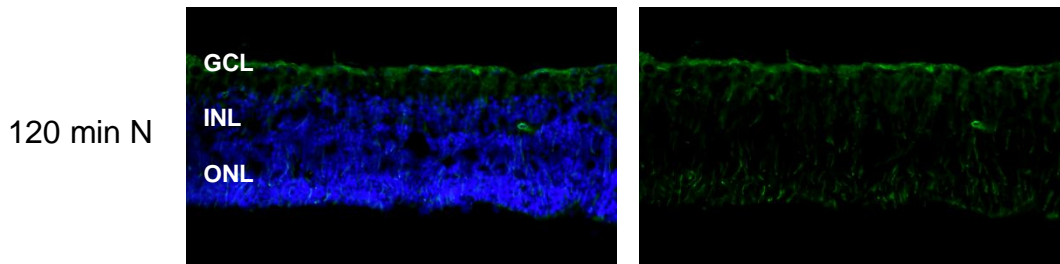


Abb. 10 Immunhistochemische Färbung (GFAP) der Ischämie-behandelten Retinas: Repräsentative Färbung der Retinas, die 72 h kultiviert (außer Retinas direkt nach Präparation) und unterschiedlich lang Ischämie-behandelt wurden (45, 60, 75, 90, 120 Minuten). Auf den Fotos ist ein Querschnitt der Retina in 200-facher Vergrößerung dargestellt. Rechts die Makroglia mithilfe des GFAP-Antikörpers markiert, links ein merge aus DAPI (alle Zellkerne) und GFAP-Färbung.

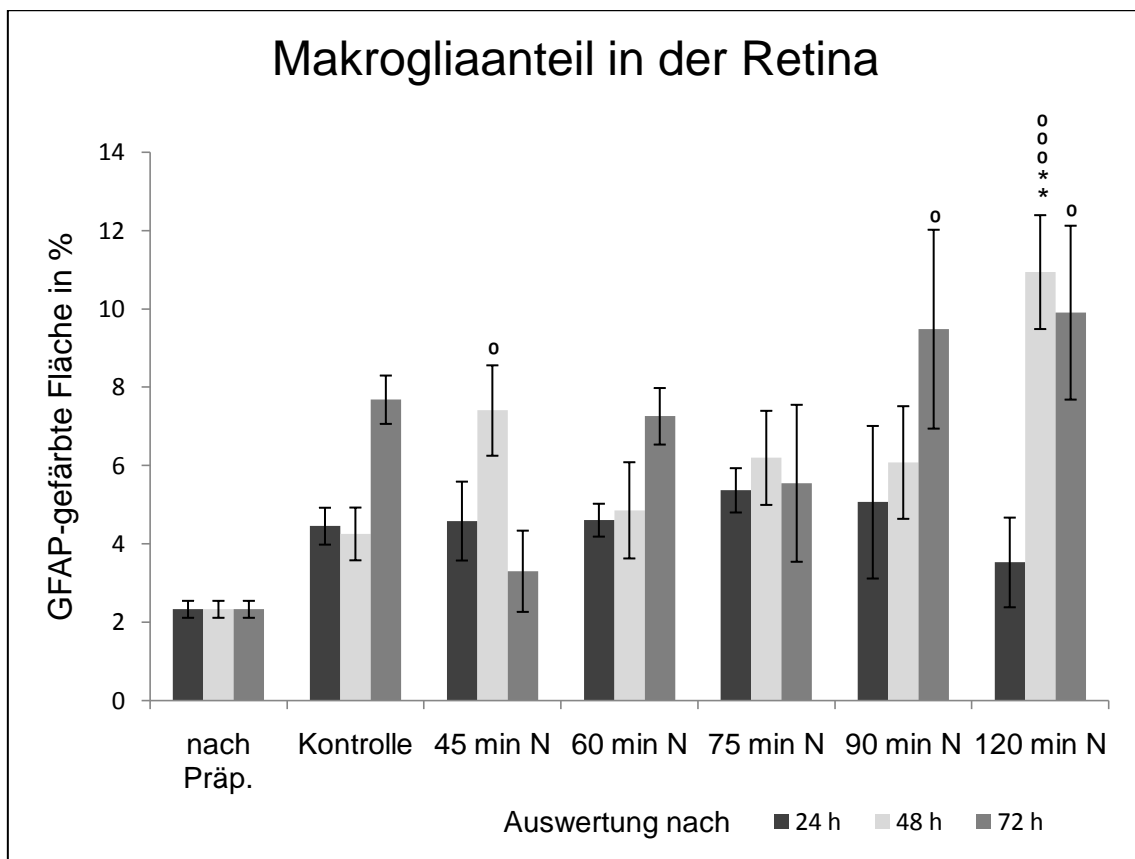


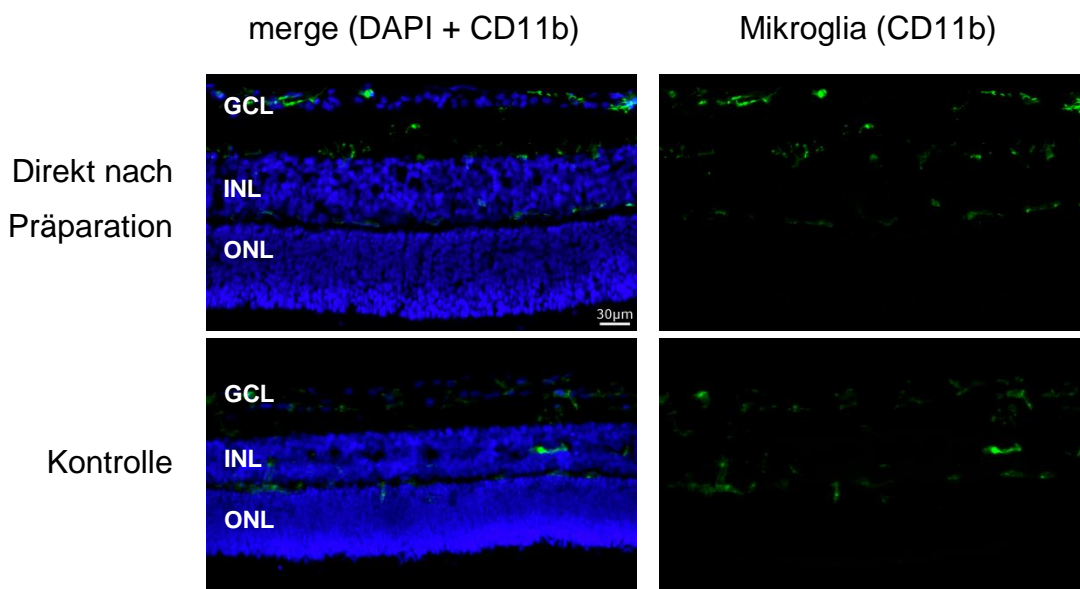
Abb. 11 Makroglia in den Ischämie-behandelten Retinas: Die Makroglia wurde mit der GFAP-Färbung angefärbt. Der prozentuale Anteil der gefärbten Fläche an der Gesamtfläche der Retina wurde im Diagramm aufgetragen. Die Auswertung erfolgte nach 24 h, 48 h und 72 h. Der Anteil an angefärbter Fläche ist bei den Ischämie-behandelten Retinas im Allgemeinen größer als bei den Retinas direkt nach Präparation. Die Auswertung nach 48 h ergibt mehr Makroglia als die nach 24 h und bei längerer Ischämie wird mehr GFAP exprimiert. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Ischämiedauer und der Makroglia-reaktion oder zwischen dem Zeitpunkt der Auswertung und der Makroglia-reaktion ist nicht festzustellen. Die statistische Signifikanz ist gekennzeichnet durch * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ gegenüber den Kontrollen und ^o

$p < 0,05$, ^{oo} $p < 0,01$, ^{ooo} $p < 0,001$ gegenüber den Retinas unmittelbar nach Präparation. Die Balken und Fehlerindikatoren geben Mittelwerte und Standardfehler an.

Nach 24 Stunden ist keine Erhöhung der Makrogliaaktivierung ersichtlich. Die Werte befinden sich bei jeder Ischämiedauer auf dem Niveau der Kontrollen. Nach 48 Stunden steigt der Makrogliaanteil nach 45minütiger Ischämie signifikant ($p < 0,05$) auf das dreifache (7,4 %) im Vergleich zu den Retinas unmittelbar nach Präparation. Nach 120minütiger Ischämie liegt der Wert der angefärbten Fläche bei 10,94 % und damit signifikant über dem der Kontrollen (4,26 %) ($p < 0,01$) und dem der Retinas, die direkt nach Präparation ausgewertet wurden (2,33 %) ($p < 0,001$). 60, 75 und 90 Minuten Stickstoffbegasung liegen mit Werten zwischen 4,86 % und 6,08 % auf dem Niveau der Kontrollen. Nach 72 Stunden führen 90 ($p < 0,05$) und 120 Minuten ($p < 0,01$) Ischämiebehandlung zum signifikanten Anstieg auf 9,48 % und 9,91 % der angefärbten Fläche gegenüber den Retinas direkt nach Präparation. Die Werte des Makrogliaanteils liegen für 45 Minuten Stickstoffbegasung bei 3,3 %, für 60 Minuten bei 7,26 % und bei 75 Minuten bei 5,55 %.

Im Allgemeinen ist der Anteil an angefärbter Fläche bei den Ischämiebehandelten Retinas größer als bei den Retinas direkt nach Präparation. Die Auswertung nach 48 h ergibt mehr aktivierte Makroglia als die nach 24 h.

3.2.2 Mikrogliareaktion nach Ischämie



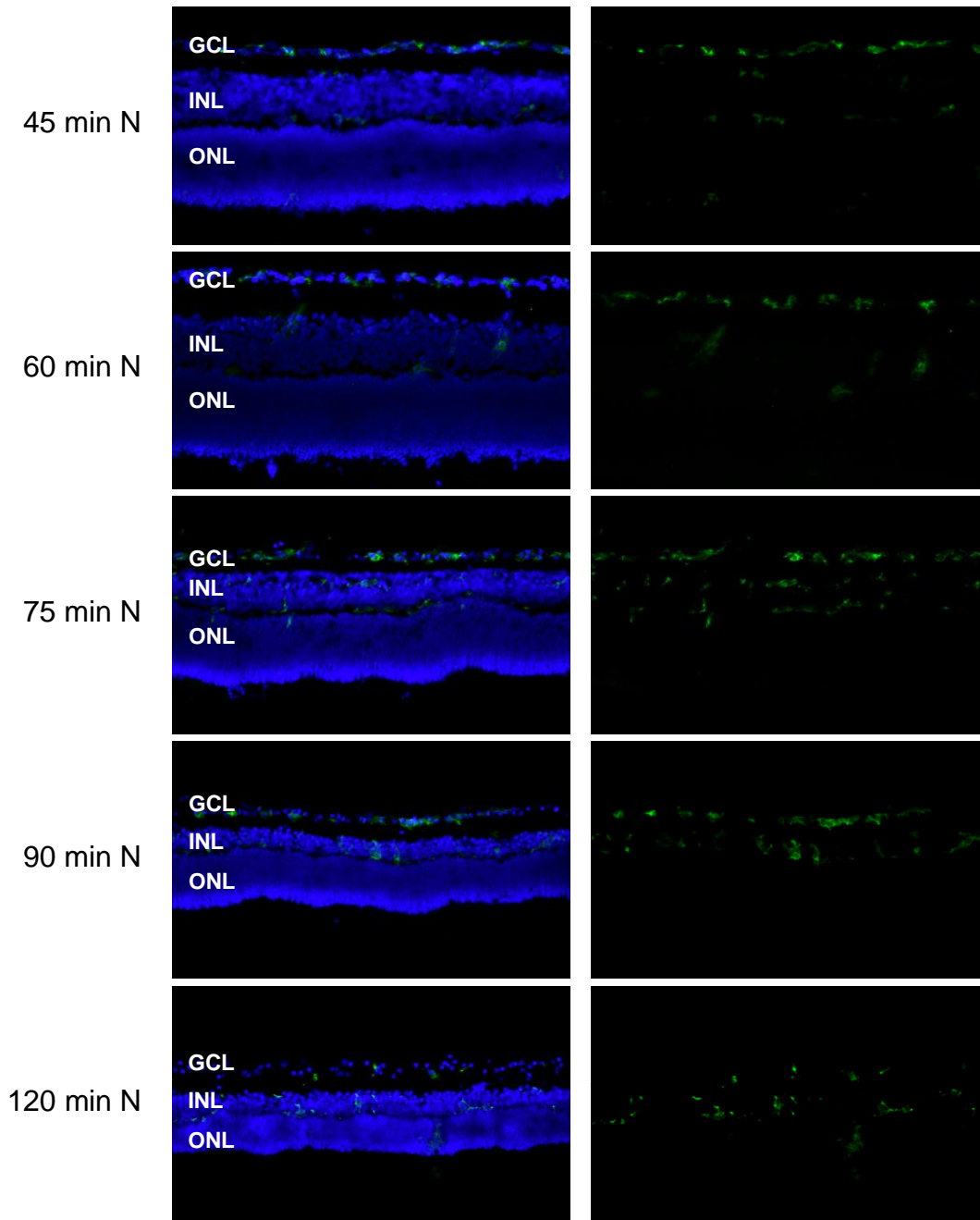


Abb. 12 Immunhistochemische Färbung (CD11b) der Ischämie-behandelten Retinas: Repräsentative Färbung der Retinas, die 48 h kultiviert (außer Retinas direkt nach Präparation) und unterschiedlich lang Ischämie ausgesetzt waren (45 min, 60 min, 75 min, 90 min, 120 min). Auf den Fotos ist ein Querschnitt der Retina in 200-facher Vergrößerung dargestellt. Rechts die Mikroglia mithilfe des CD11b-Antikörpers markiert, links ein merge aus DAPI (alle Zellkerne) und CD11b-Färbung.

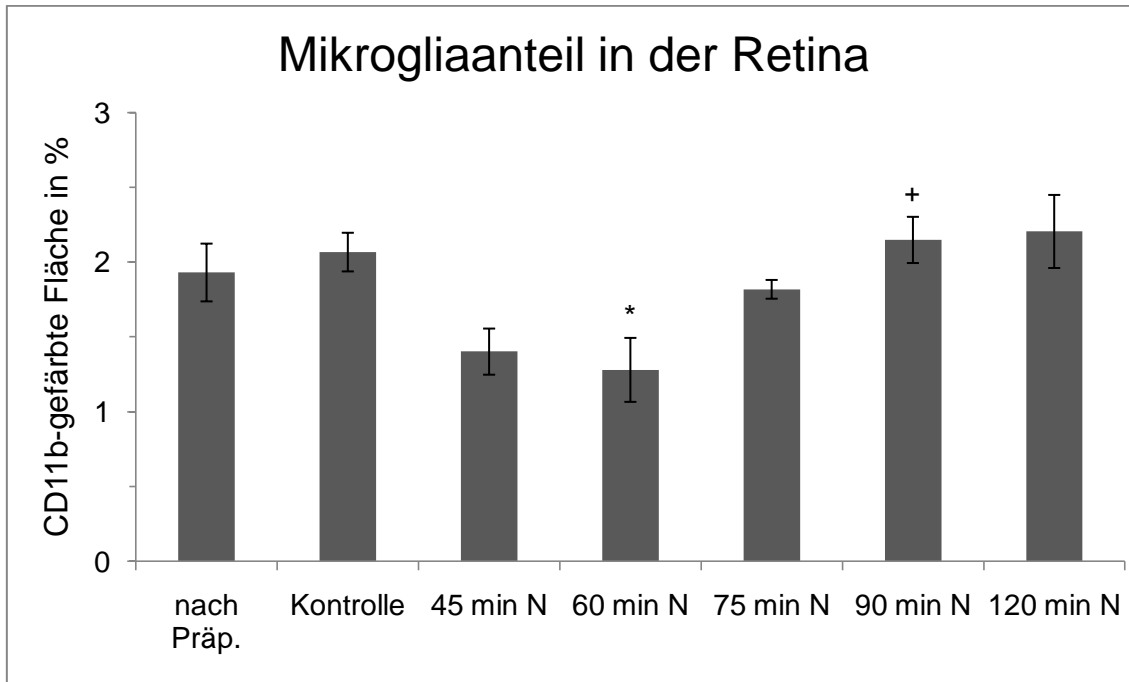


Abb. 13 Mikroglia in den Ischämie-behandelten Retinas: Der prozentuale Anteil der gefärbten Fläche an der Gesamtfläche der Retina ist den unterschiedlichen Ischämiezeiten zugeordnet. Die Retinas wurden unterschiedlich lange der Ischämie ausgesetzt (45, 60, 75, 90, 120 Minuten). Der Versuch wurde nach 48 Stunden beendet. Der Anteil an Mikroglia sinkt bei 60 min N signifikant unter den der Kontrollen. 45, 75, 90 und 120 Minuten Ischämie haben keine signifikante Auswirkung auf die Mikrogliaaktivierung. Die statistische Signifikanz ist angegeben durch * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ gegenüber den Kontrollen und + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ gegenüber 60 min N. Die Balken und Fehlerindikatoren geben Mittelwerte und Standardfehler an.

Die Untersuchungen von Matthias Blak zeigten, dass der Abfall an RGZ nur nach 48 h und 72 h signifikant gegenüber den Kontrollen war. Seine Versuche ergaben auch, dass je länger die Explantate kultiviert wurden, desto weniger RGZ und desto mehr apoptotische Zellen vorhanden waren. Die Anzahl der RGZ reduzierte sich nach 72 h um 50%. Die Tatsache, dass die Axotomie an sich zum Zelluntergang führt, fällt nach einer Kultivierung von 72 h schwerer ins Gewicht als nach 48 h. Beurteilt werden sollte aber der Tod durch Ischämie und nicht durch Axotomie (Blak 2015). Der sinnvollste und interessanteste Zeitpunkt der Auswertung ist daher nach 48 h, da dies einerseits der erste Zeitpunkt war an dem die Ergebnisse der RGZ signifikant waren und andererseits noch nicht so viele Zellen aufgrund der Axotomie abgestorben sind. Deshalb wurde die Mikroglia-Aktivierung nur nach 48 h ausgewertet. Auch die Therapieversuche wurden deshalb nach 48 h ausgewertet.

Die Ischämiedauer von 60 Minuten reduziert signifikant nach 48 h den Anteil an Mikroglia um ca. 0,8 % auf 1,3 % gegenüber den Kontrollen ($p < 0,05$). Bei 45, 75, 90 und 120 Minuten zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Retinas direkt nach Präparation und den Kontrollen.

Die vorangegangenen Versuche sollten zeigen, wie sich die Aktivierung der Makroglia und Mikroglia auf Glutamat- und Ischämienstress verhält. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Glutamatstress in meinen Versuchen die Gliareaktion nicht beeinflusst. Auch eine 75-minütige Ischämie ruft keine Aktivierung der Gliazellen hervor. Insgesamt ist aber der Anteil an GFAP-gefärbter Fläche bei den Ischämie-behandelten Retinas größer als bei den Retinas direkt nach Präparation. Die Auswertung nach 48 h ergibt mehr aktivierte Makroglia als die nach 24 h. Ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen ist erst bei 120 Minuten Ischämienstress feststellbar. Auf die Mikroglia hat der Ischämienstress keine aktivierende Auswirkung.

Mit den folgenden Versuchen sollen nun zwei Therapiemöglichkeiten getestet werden. Es wird die Gliareaktion der Glutamat- und Ischämie-gestressten Retinas untersucht, die mit Hypothermie oder CSA therapiert wurden.

3.3 Hypothermie

Zur Erzeugung der Hypothermie wurden die Retinakulturen direkt nach der Präparation für vier Stunden bei Temperaturen von 30 °C, 20 °C und 10 °C kultiviert. Die Auswertung erfolgte nach 48 Stunden. Die weitere Vorgehensweise entspricht der in 3.1 beschriebenen.

3.3.1 Makrogliareaktion nach Hypothermie

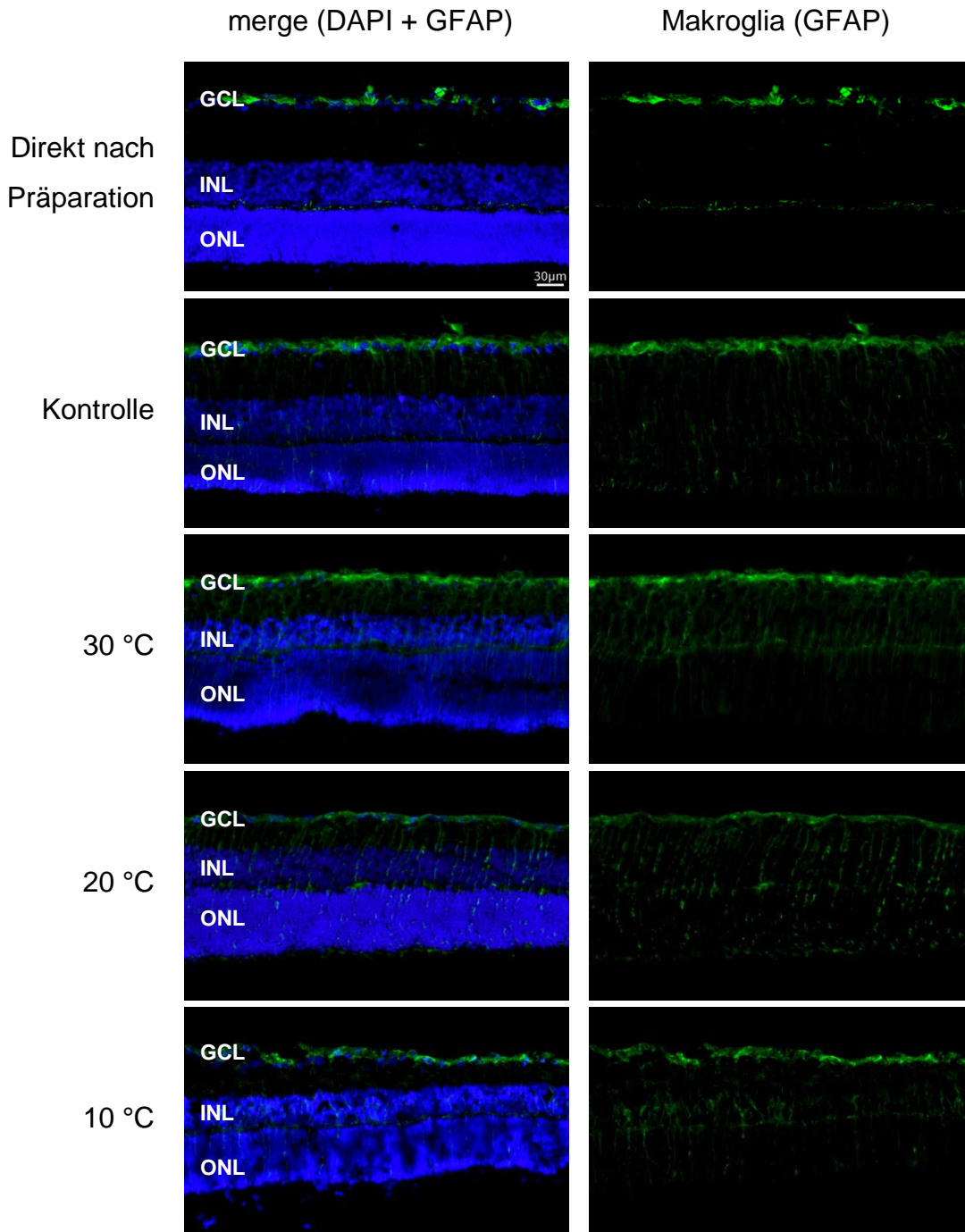


Abb. 14 Immunhistochemische Färbung (GFAP) der Hypothermie-behandelten Retinas: Repräsentative Färbung der Retinas, die 48 h kultiviert (außer Retinas direkt nach Präparation) und Hypothermie-behandelt wurden (10 °C, 20 °C, 30 °C). Auf den Fotos ist ein Querschnitt der Retina in 200-facher Vergrößerung dargestellt. Rechts die Makroglia mithilfe des GFAP-Antikörpers markiert, links ein *merge* aus DAPI (alle Zellkerne) und GFAP-Färbung.

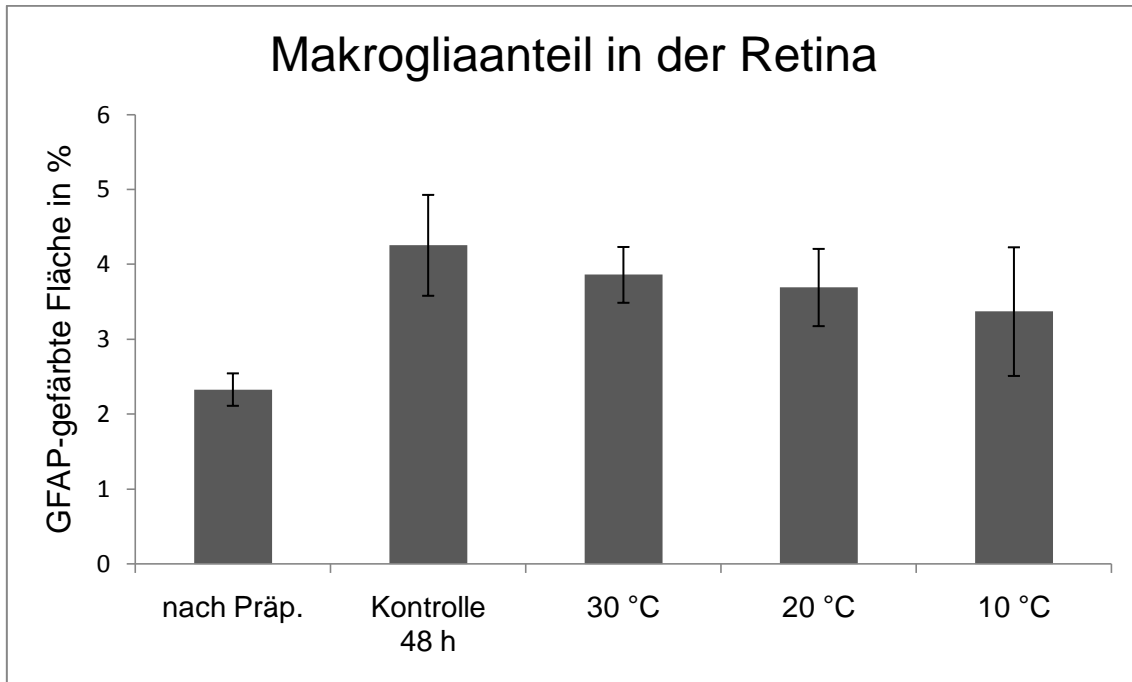


Abb. 15 Makroglia in den Hypothermie-behandelten Retinas: Dargestellt ist der prozentuale Anteil der gefärbten Fläche an der Gesamtfläche der Retina. Die Retinakulturen wurden direkt nach der Präparation für vier Stunden einer Umgebungstemperatur von 30 °C, 20 °C oder 10 °C ausgesetzt und nach 48 h ausgewertet. Die Makroglia-reaktion sinkt mit abnehmender Temperatur, allerdings nicht signifikant. Die Hypothermie hat keinen ausschlaggebenden Einfluss auf die Gliose. Die Balken und Fehlerindikatoren geben Mittelwerte und Standardfehler an.

Der Makrogliaanteil sinkt leicht mit Abnahme der Temperatur, allerdings nicht signifikant. Vergleicht man die Hypothermie-behandelten Retinas jedoch mit den direkt nach Präparation ausgewerteten Retinas, ist der Anteil an aktivierter Makroglia bei jeder Temperatur größer. Der Wert liegt bei einer Hypothermie von 30 °C bei 3,86 %, von 20 °C bei 3,7 % und von 10 °C bei 3,37 % im Vergleich zu 4,26 % bei den Kontrollen und 2,33 % bei den Retinas direkt nach Präparation.

3.3.2 Mikrogliareaktion nach Hypothermie

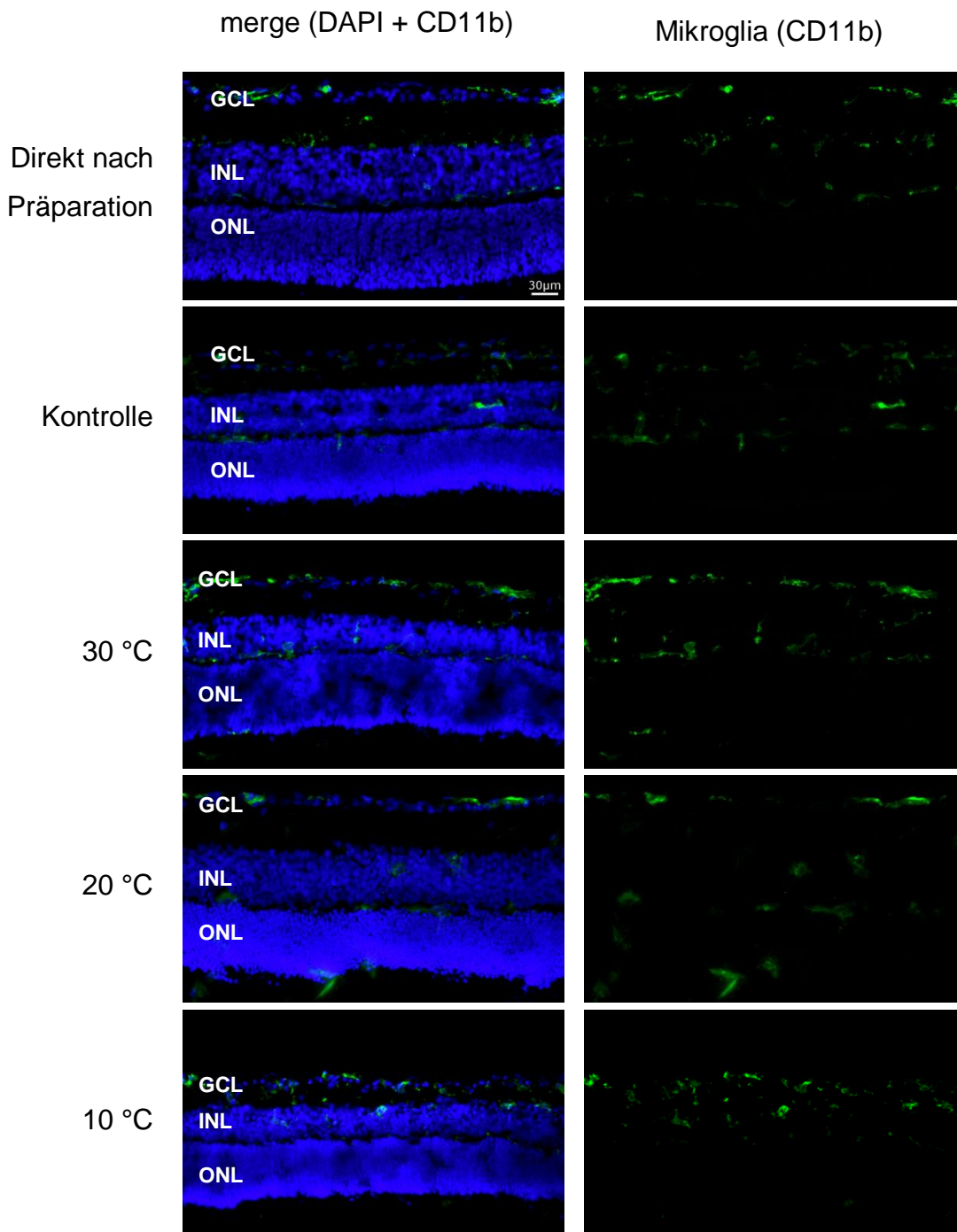


Abb. 16 Immunhistochemische Färbung (CD11b) der Hypothermie-behandelten Retinas: Repräsentative Färbung der Retinas, die 48 h kultiviert (außer Retinas direkt nach Präparation) und Hypothermie-behandelt wurden (30 °C, 20 °C, 10 °C). Auf den Fotos ist ein Querschnitt der Retina in 200-facher Vergrößerung dargestellt. Rechts die Mikroglia mithilfe des CD11b-Antikörpers markiert, links ein *merge* aus DAPI (alle Zellkerne) und CD11b-Färbung.

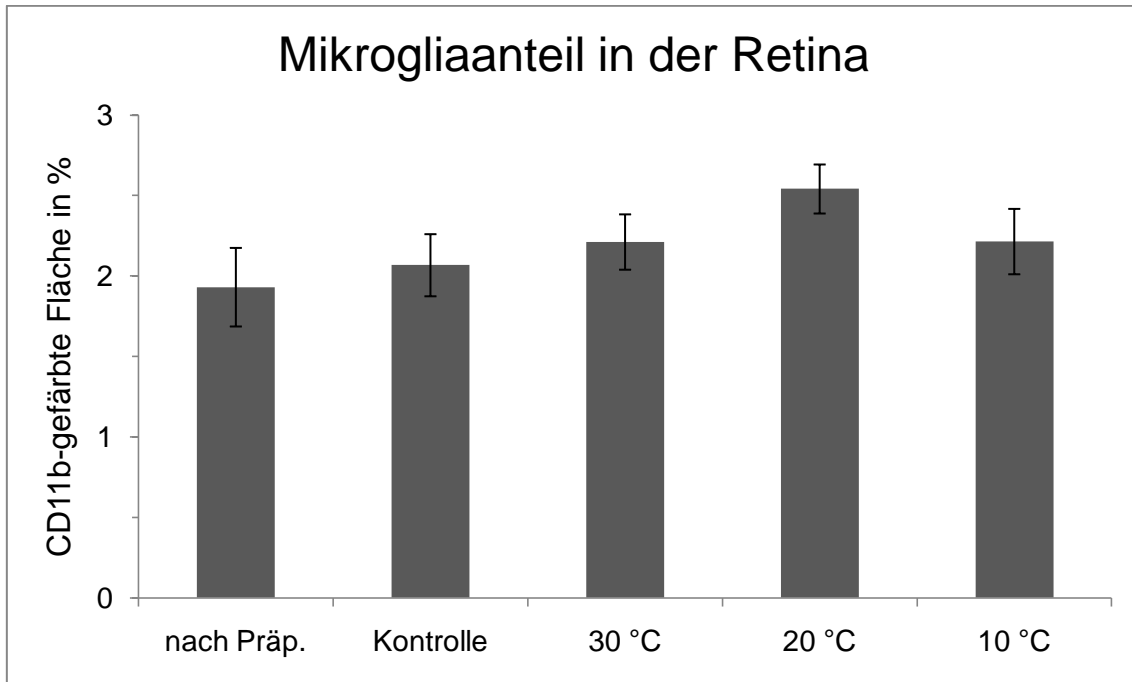


Abb. 17 Mikroglia in den Hypothermie-behandelten Retinas: Der prozentuale Anteil der gefärbten Fläche an der Gesamtfläche der Retina ist gegen die verschiedenen Temperaturen aufgetragen. Die Retinas wurden nach der Präparation vier Stunden lang in einer Umgebungstemperatur von 30 °C, 20 °C oder 10 °C belassen. Die Hypothermie-behandelten Retinas zeigen geringfügig mehr Mikroglia als die Kontrollen. Die Balken und Fehlerindikatoren geben Mittelwerte und Standardfehler an.

Dieser Versuch stellt ein Vorversuch dar, mit dem der Effekt der Hypothermie auf die Gliazellen getestet werden sollte. Der Anteil an Mikroglia der Hypothermie-behandelten Retinas zeigt keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollen und den Retinas, die unmittelbar nach der Präparation ausgewertet wurden. Die Hypothermie an sich ruft also keine Schädigung der Netzhäute hervor. Die Werte der Hypothermie-behandelten Retinas liegen minimal über den Kontrollen. Bei 20 °C ist der Mikrogliaanteil am größten mit 2,54 % gegenüber den Kontrollen mit 2,07 %. Bei 30 °C sind es 2,21 %, bei 10 °C 2,22 %.

3.4 Therapie mit Hypothermie bei Glutamatstress

3.4.1 Makrogliareaktion nach Hypothermie und 1 mM Glutamat

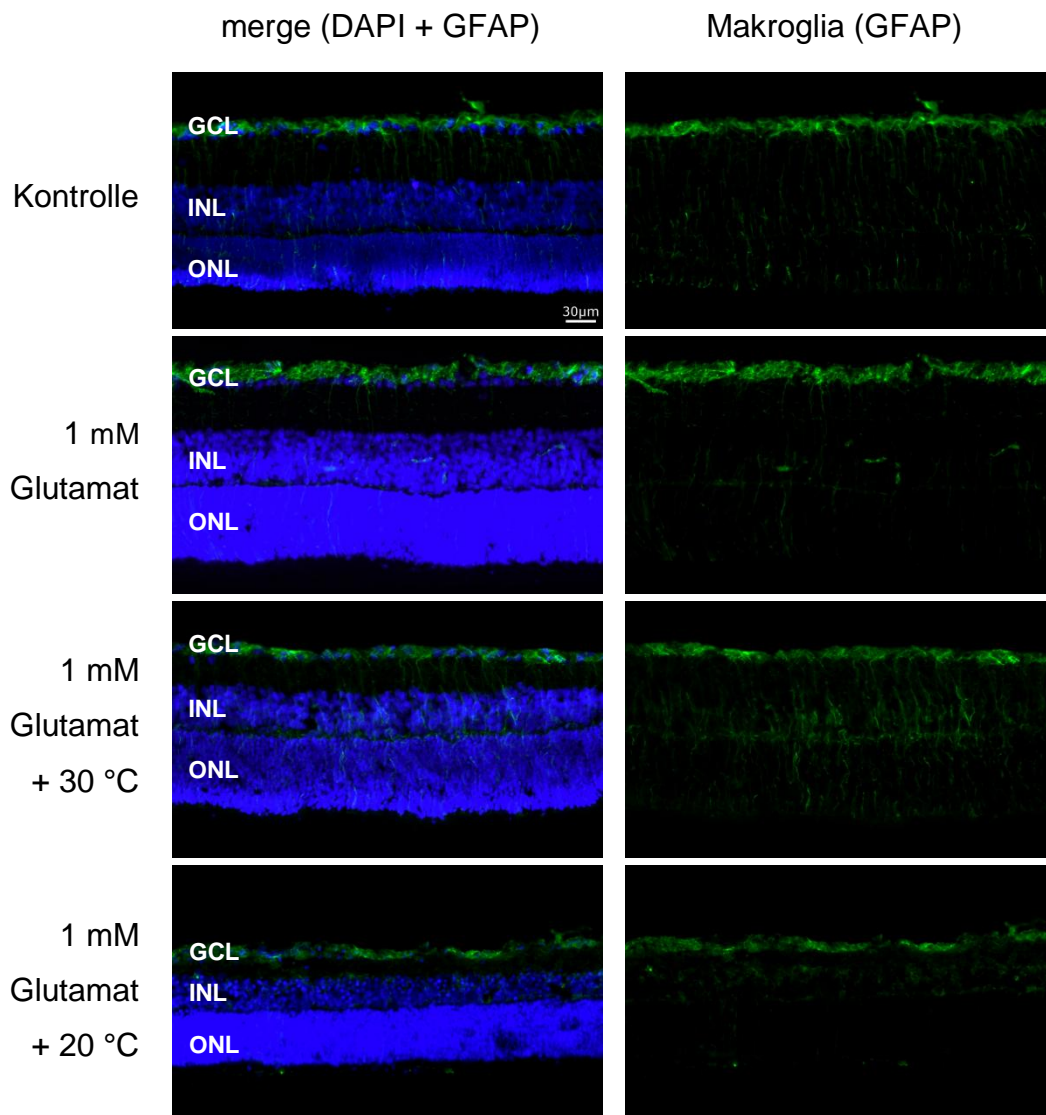


Abb. 18 Immunhistochemische Färbung (GFAP) der Glutamat- und Hypothermie-behandelten Retinas: Repräsentative Färbung der Retinas, die 48 h kultiviert (außer Retinas direkt nach Präparation), die ersten 24 h Glutamat-behandelt (1 mM im Medium) und die ersten vier Stunden bei hypothermen Umgebungstemperaturen belassen wurden (20 °C, 30 °C). Auf den Fotos ist ein Querschnitt der Retina in 200-facher Vergrößerung dargestellt. Rechts die Makroglia mithilfe des GFAP-Antikörpers markiert, links ein *merge* aus DAPI (alle Zellkerne) und GFAP-Färbung.

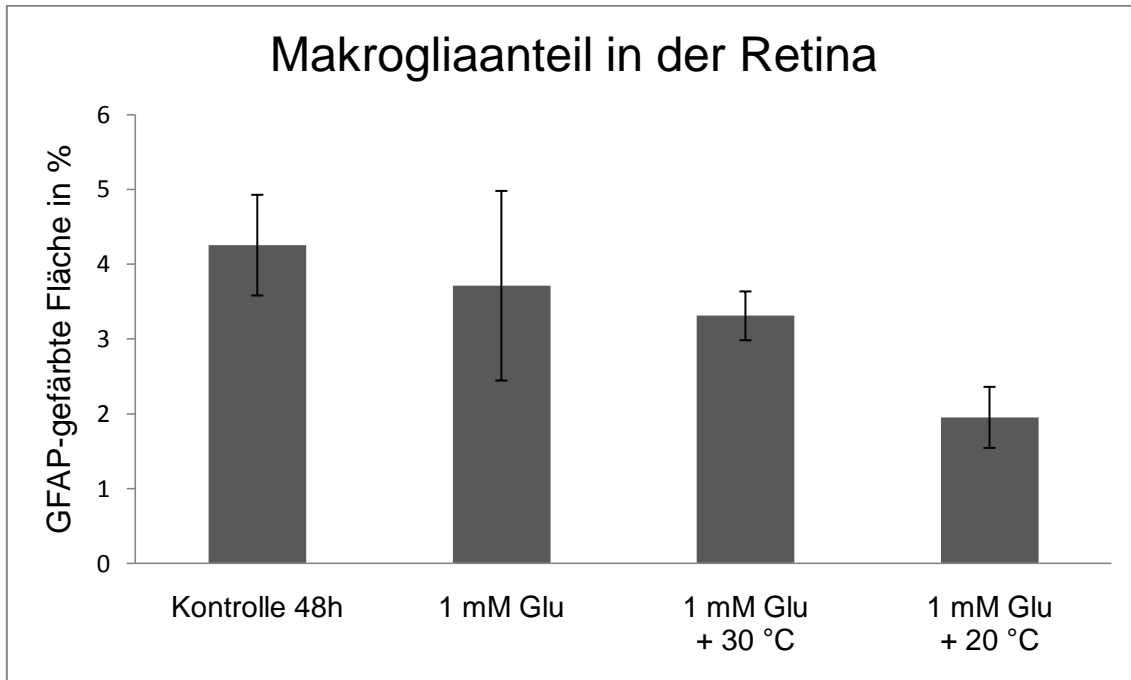


Abb. 19 Makroglia in Glutamat- und Hypothermie-behandelten Retinas: Es ist die GFAP-gefärbte Fläche in Prozent bezogen auf die Gesamtfläche der Retina dargestellt. Das Diagramm zeigt die angefärbte Makroglia nach 48 h bei Glutamatbehandlung (1 mM) und Hypothermie (20 °C und 30 °C). Der Makrogliaanteil der Retinas nimmt mit sinkender Temperatur ab. Eine Hypothermie von 20 °C wirkt protektiv und halbiert die Makrogliaaktivierung im Vergleich zur Kontrolle. Die Balken und Fehlerindikatoren geben Mittelwerte und Standardfehler an.

In diesem Versuch wurde untersucht, ob die Hypothermie einen protektiven Effekt hat und eine Gliose reduzieren kann, bei gleichzeitiger Einwirkung von Glutamat, das toxisch wirkt. Dafür wurden zwei verschiedene Temperaturen, 30 °C und 20 °C, angewandt. Die Retinas wurden 24 Stunden mit Glutamat im Medium kultiviert. Die ersten vier Stunden davon bei Umgebungstemperaturen von 30 °C oder 20 °C. Die Auswertung erfolgte nach 48 Stunden.

Die Kultivierung bei 30 °C erreicht eine Verringerung des Makrogliaanteils auf 3,31 % im Vergleich zu den 1 mM-Glutamat-behandelten Retinas mit 3,71 % und den Kontrollen mit 4,26 %. Bei 20 °C fällt der Wert nochmals ab auf 1,95 %. Der Abfall stellt sich nicht als signifikant dar.

Die CD11b-Färbung wurde bei den Schnitten der Glutamat- und Hypothermie-behandelten Retinas nicht durchgeführt, da bei Betrachtung der bisherigen Ergebnisse nicht von zusätzlichen Erkenntnissen ausgegangen werden kann.

3.5 Therapie mit Hypothermie nach Ischämie

3.5.1 Makrogliareaktion nach Hypothermie und Ischämie

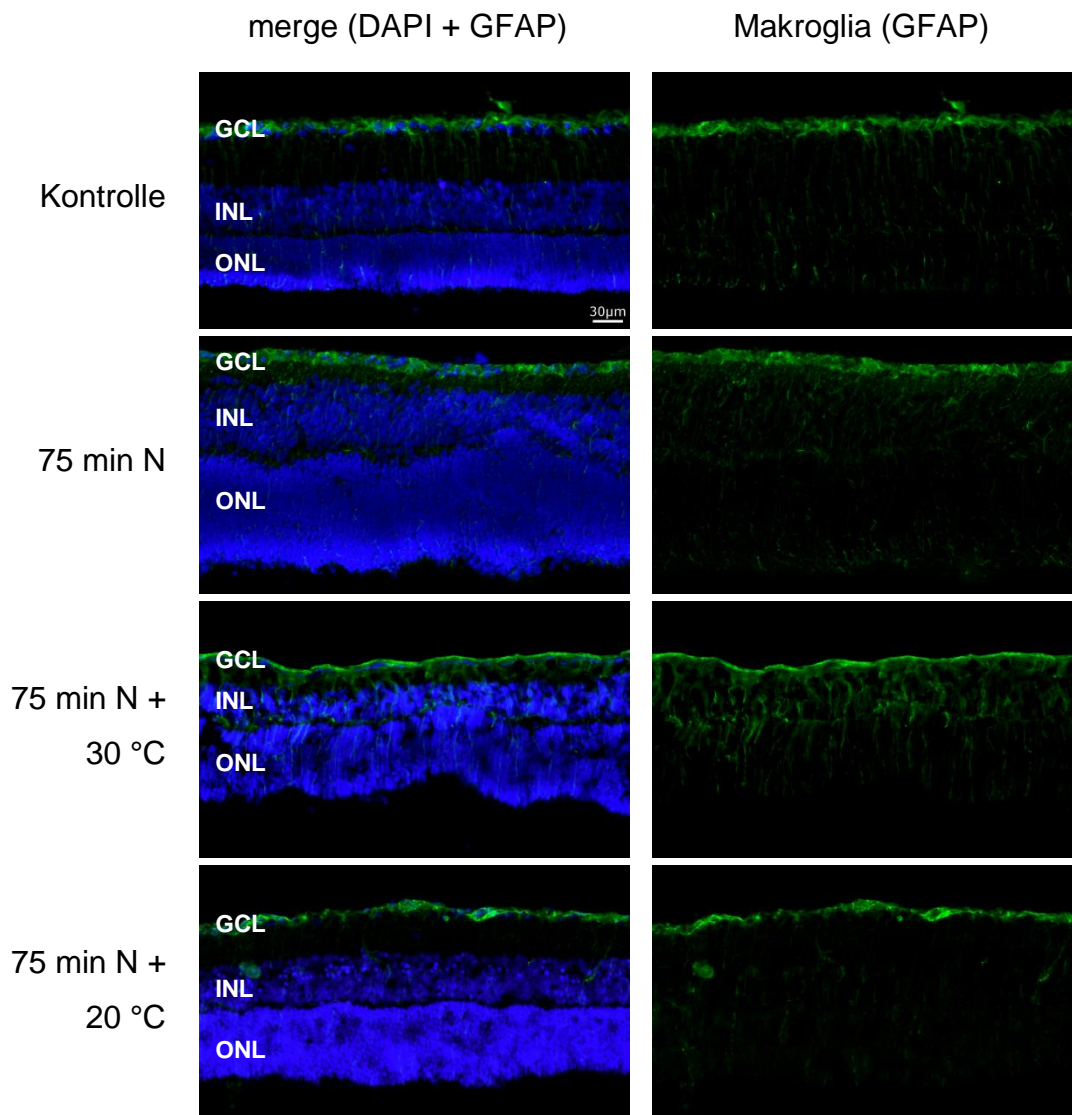


Abb. 20 Immunhistochemische Färbung (GFAP) der Ischämie- und Hypothermie-behandelten Retinas: Repräsentative Färbung der Retinas, die 48 h kultiviert (außer Retinas direkt nach Präparation), 75 min. Ischämie-behandelt und die ersten vier Stunden bei hypothermen Umgebungstemperaturen belassen wurden (20 °C, 30 °C). Auf den Fotos ist ein Querschnitt der Retina in 200-facher Vergrößerung dargestellt. Rechts die Makroglia mithilfe des GFAP-Antikörpers markiert, links ein *merge* aus DAPI (alle Zellkerne) und GFAP-Färbung.

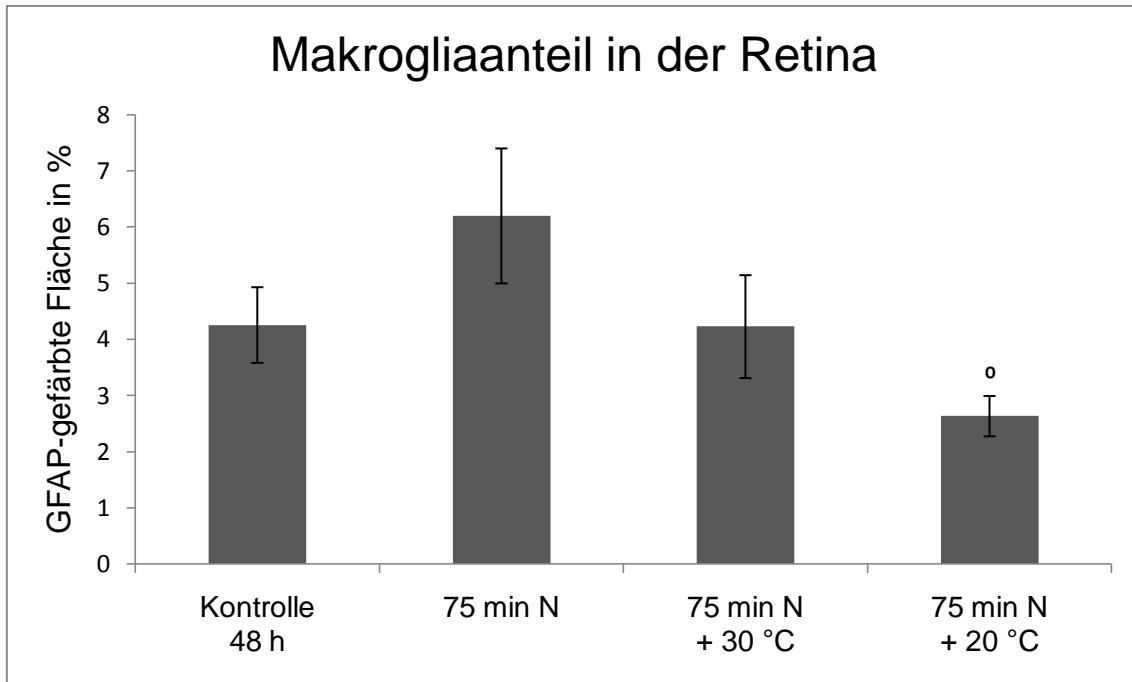


Abb. 21 Makroglia in den Ischämie- und Hypothermie-behandelten Retinas: Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil der gefärbten Fläche an der Gesamtfläche der Retina und somit den Anteil aktivierter Makroglia an der Retina nach 48 h infolge 75-minütiger Ischämie-Behandlung und Hypothermie (20 °C und 30 °C) über die ersten vier Stunden. Eine Ischämie von 75 min. führt zum Anstieg des Makrogliaanteils. Bei einer Hypothermie von 30 °C bleibt der Anteil unter dem Wert der reinen Ischämie und auf Höhe der Kontrollen. Bei 20 °C sinkt der Wert der angefärbten Fläche unter den Wert der Kontrollen und signifikant unter den Wert der reinen Ischämie. Die Hypothermie-Behandlung vermindert die Gliose. ° $p < 0,05$, °° $p < 0,01$, °°° $p < 0,001$ gibt die statistische Signifikanz gegenüber reiner Ischämie-Behandlung an. Die Balken und Fehlerindikatoren geben Mittelwerte und Standardfehler an.

Es wurde untersucht, ob die Hypothermie-Behandlung einen Einfluss auf die Ausbildung einer Gliose nach 75-minütiger Ischämie hat. Die Ischämiekammer wurde vor der Begasung mit Stickstoff auf 30 °C bzw. 20 °C heruntergekühlt. Die Retinas wurden nach 48 Stunden eingebettet und ausgewertet.

Eine Ischämiebehandlung von 75 Minuten bewirkt einen Anstieg der Makroglia von 4,26 % (Kontrollen) auf 6,2 %. Die Hypothermie-Behandlung mit 30 °C in den ersten vier Stunden lässt den Wert wieder auf Höhe der Kontrollen sinken (4,23 %). Bei 20 °C kommt es zu einem signifikanten Abfall auf 2,63 % gegenüber der reinen Ischämie.

3.5.2 Mikrogliareaktion nach Hypothermie und Ischämie

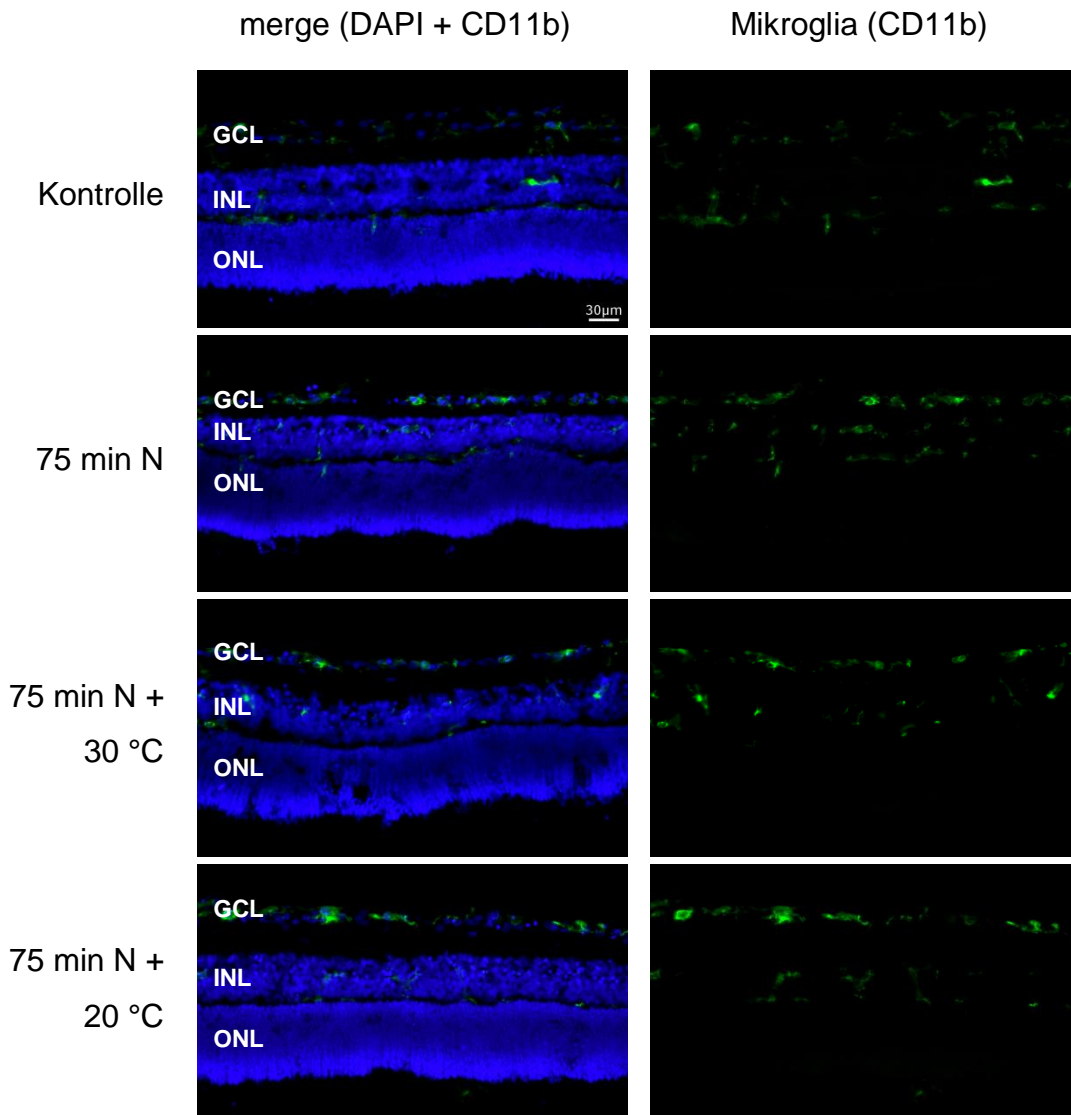


Abb. 22 Immunhistochemische Färbung (CD11b) der Ischämie- und Hypothermie-behandelten Retinas: Repräsentative Färbung der Retinas, die 48 h kultiviert (außer Retinas direkt nach Präparation), 75 min. Ischämie-behandelt und die ersten vier Stunden bei hypothermen Umgebungstemperaturen belassen wurden (20 °C, 30 °C). Auf den Fotos ist ein Querschnitt der Retina in 200-facher Vergrößerung dargestellt. Rechts die Mikroglia mithilfe des CD11b-Antikörpers markiert, links ein *merge* aus DAPI (alle Zellkerne) und CD11b-Färbung.

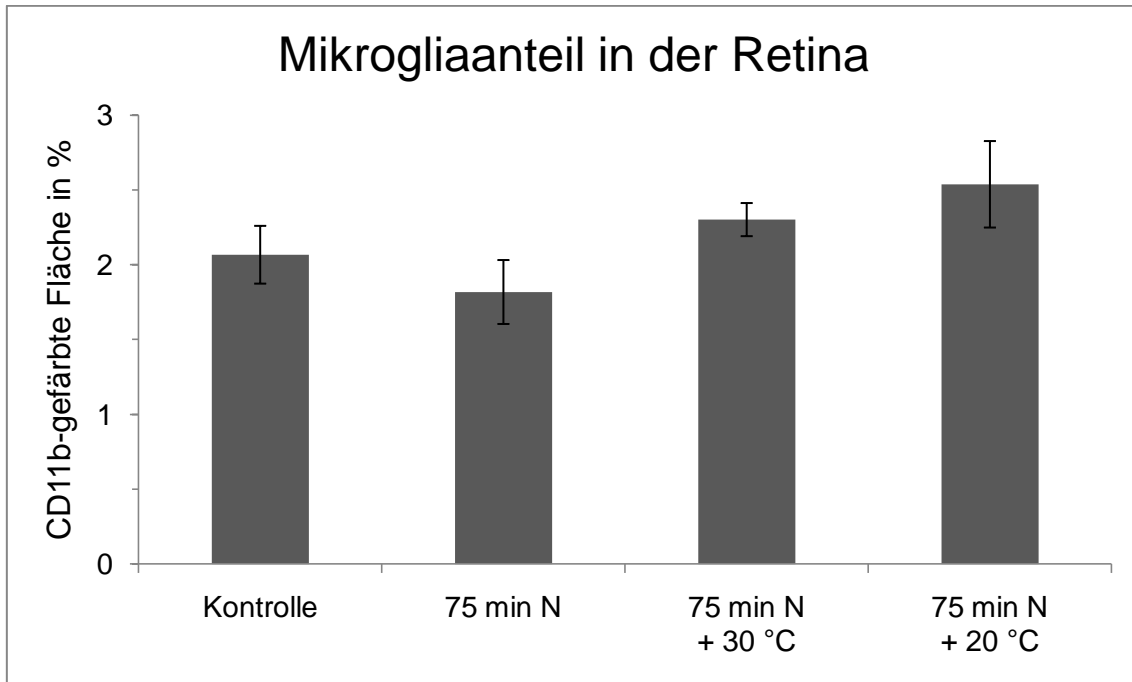


Abb. 23 Mikroglia in den Ischämie- und Hypothermie-behandelten Retinas: Dargestellt ist der prozentuale Anteil der gefärbten Fläche an der Gesamtfläche der Retina. Die Retinakulturen wurden 75 min Ischämie-behandelt und die ersten vier Stunden in einer hypothermen Umgebungstemperatur belassen (20 °C und 30 °C). Der Anteil an Mikroglia entspricht bei beiden Temperaturen dem Wert der reinen Ischämie. Die Hypothermie hat keinen positiven Einfluss auf die Aktivierung der Mikroglia. Die Balken und Fehlerindikatoren geben Mittelwerte und Standardfehler an.

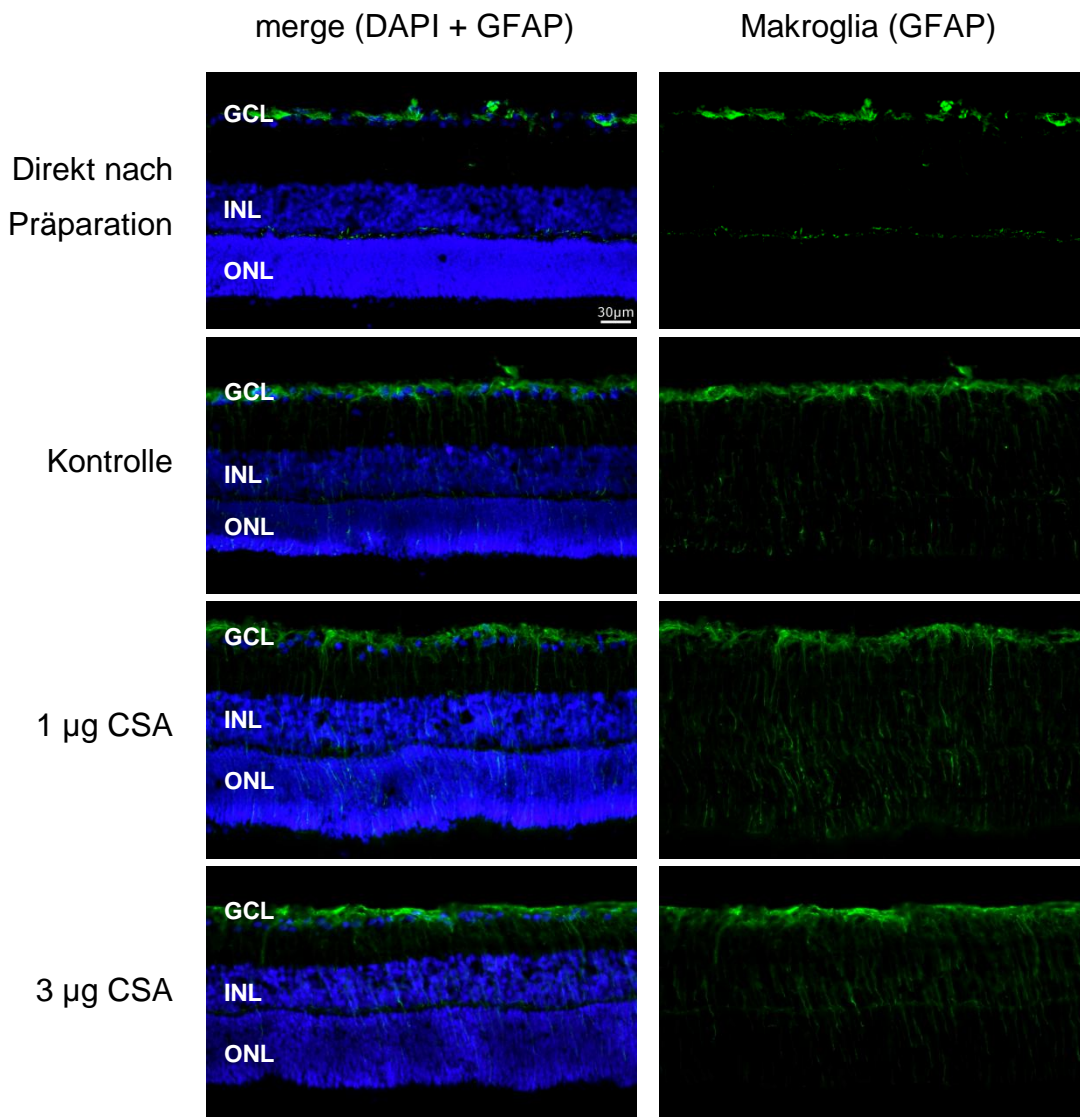
Es ist kein positiver Einfluss der Hypothermie auf den Anteil an Mikroglia in den Retinas erkennbar. Bei beiden Temperaturen liegt der Wert etwas über dem der Ischämie-behandelten Retinas und der Kontrollen. Wurde unter Hypothermie mit Stickstoff begast und die Retinas für vier Stunden bei 30 °C belassen erhöhte sich der Anteil auf 2,3 %, bei 20 °C auf 2,54 % im Vergleich zur reinen Ischämie (1,82 %) und den Kontrollen (2,07 %).

3.6 Cyclosporin A (CSA)

Das Medikament Cyclosporin A gehört zu den Immunsuppressiva und kann möglicherweise den überschießenden Entzündungs- und Wundheilungsprozess im Rahmen der reaktiven Gliose beeinflussen.

Zur Untersuchung der Auswirkung von CSA in Bezug auf die retinalen Gliazellen wurden Verdünnungen von 1 µg/ml bis 9 µg/ml CSA im Medium zur Kultivierung während den ersten 24 Stunden verwendet. Nach 48 Stunden wurden die Explantate eingebettet und ausgewertet.

3.6.1 Makrogliareaktion nach CSA



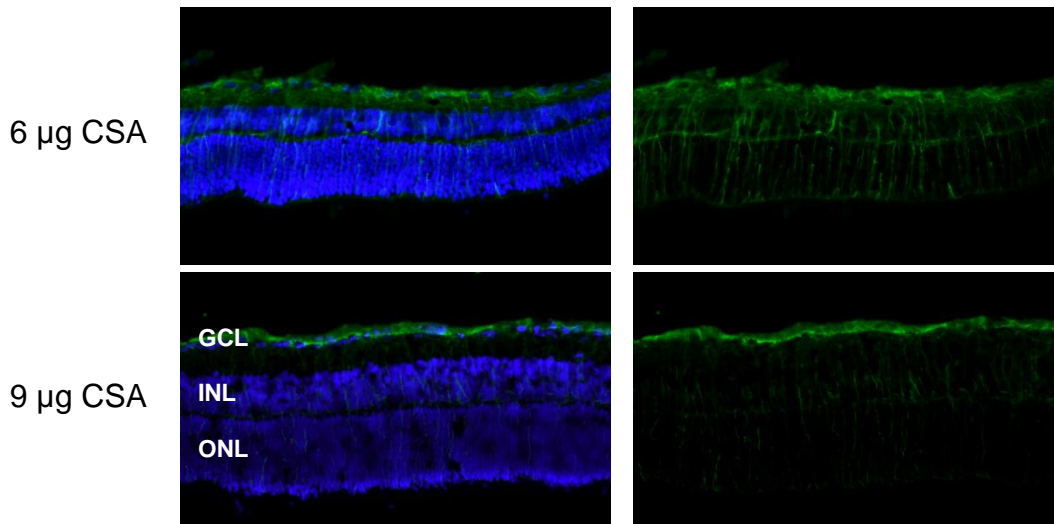


Abb. 24 Immunhistochemische Färbung (GFAP) der CSA-behandelten Retinas: Repräsentative Färbung der Retinas, die 48 h kultiviert (außer Retinas direkt nach Präparation) und mit CSA in verschiedenen Konzentrationen behandelt wurden (1 µg/ml, 3 µg/ml, 6 µg/ml, 9 µg/ml). Auf den Fotos ist ein Querschnitt der Retina in 200-facher Vergrößerung dargestellt. Rechts die Makroglia mithilfe des GFAP-Antikörpers markiert, links ein *merge* aus DAPI (alle Zellkerne) und GFAP-Färbung.

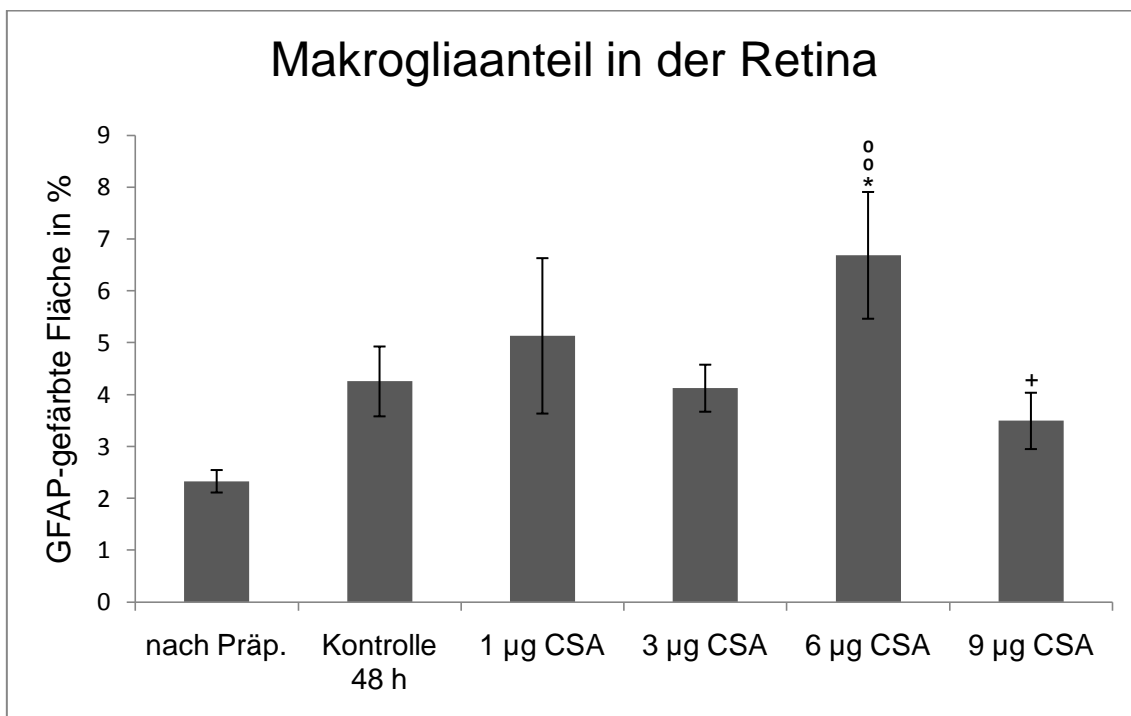
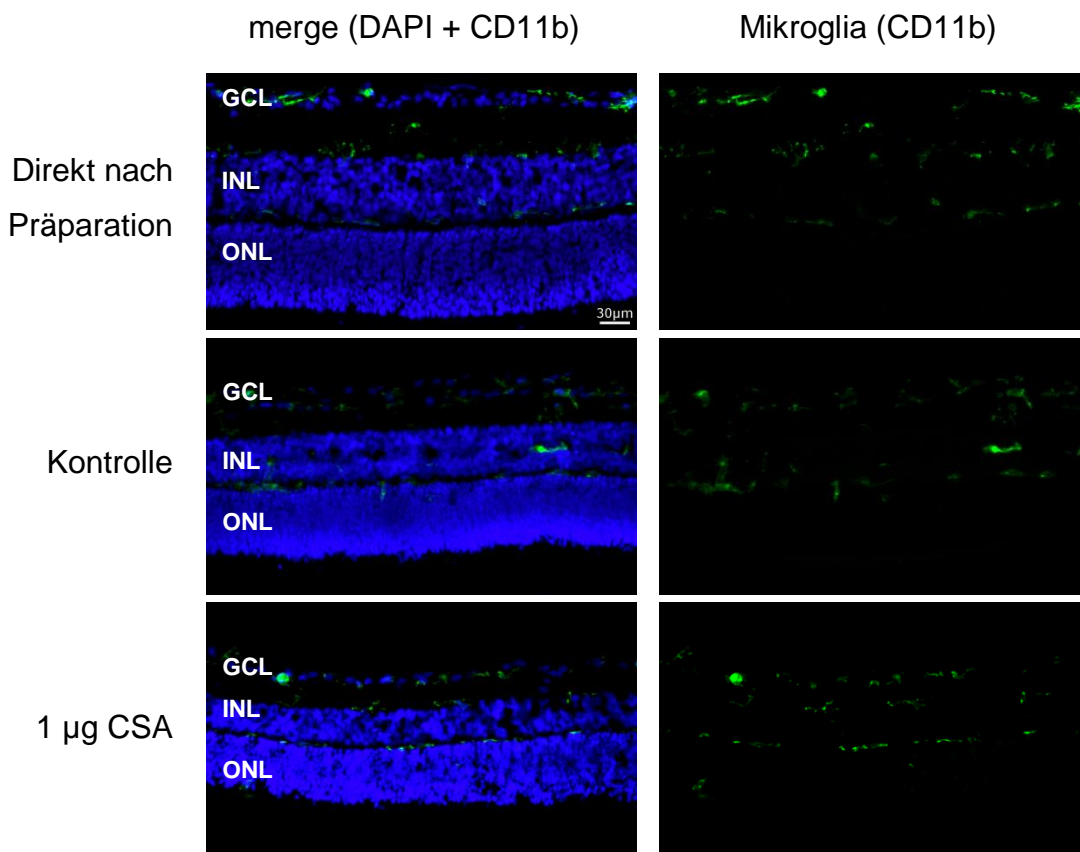


Abb. 25 Makroglia in den CSA-behandelten Retinas: Es ist der prozentuale Anteil der gefärbten Fläche an der Gesamtfläche der Retina dargestellt. Die Auswertung erfolgte nach 48 h. Es wurden vier CSA-Konzentrationen angewendet (1 µg/ml, 3 µg/ml, 6 µg/ml, 9 µg/ml). Der Anteil an Makroglia blieb bei den Konzentrationen 1 µg/ml, 3 µg/ml und 9 µg/ml nahezu unbeeinflusst im Vergleich zu den Kontrollen. Bei der Konzentration von 6 µg/ml stieg der Wert signifikant gegenüber den Kontrollen und den Retinas unmittelbar nach Präparation. Eine Konzentration von 6 µg CSA führt zur Aktivierung der Makroglia. Die statistische Signifikanz ist dargestellt durch * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ***

$p < 0,001$ gegenüber den Kontrollen, $^{\circ} p < 0,05$, $^{\circ\circ} p < 0,01$, $^{\circ\circ\circ} p < 0,001$ gegenüber den Retinas unmittelbar nach Präparation und $+ p < 0,05$, $++ p < 0,01$, $+++ p < 0,001$ gegenüber $6 \mu\text{g CSA}$. Die Balken und Fehlerindikatoren geben Mittelwerte und Standardfehler an.

Der Versuch zeigt keine klare Tendenz inwieweit sich CSA positiv oder negativ auswirkt. Bei der Behandlung mit $1 \mu\text{g CSA}$ im Medium steigt der Wert von $4,26 \%$ (Kontrollen) auf $5,13 \%$. Bei $3 \mu\text{g CSA}$ im Medium entspricht der Anteil an Makroglia mit $4,12 \%$ wiederum nahezu dem der Kontrollen. Werden die Retinas die ersten 24 Stunden mit $6 \mu\text{g/ml CSA}$ im Medium kultiviert, kommt es zu einem signifikanten Anstieg auf $7,62 \%$ gegenüber den Kontrollen ($p < 0,05$) und den Retinas, die unmittelbar nach Präparation ausgewertet wurden ($p < 0,001$). Bei einer Konzentration von $9 \mu\text{g/ml}$ fällt der Wert jedoch wieder. Er liegt mit $5,03 \%$ unter den Kontrollen und über den Retinas direkt nach Präparation.

3.6.2 Mikrogliareaktion nach CSA



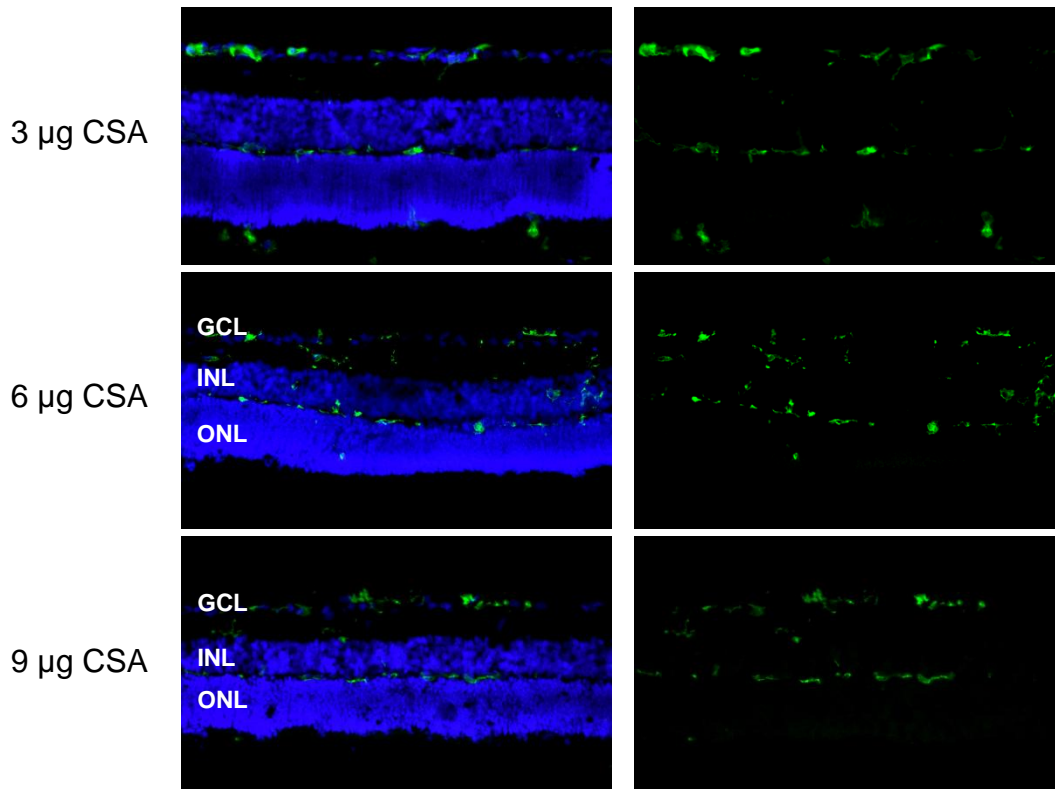


Abb. 26 Immunhistochemische Färbung (CD11b) der CSA-behandelten Retinas: Repräsentative Färbung der Retinas, die 48 h kultiviert (außer Retinas direkt nach Präparation) und mit CSA in verschiedenen Konzentrationen behandelt wurden (1, 3, 6, 9 µg/ml). Auf den Fotos ist ein Querschnitt der Retina in 200-facher Vergrößerung dargestellt. Rechts die Mikroglia mithilfe des CD11b-Antikörpers markiert, links ein merge aus DAPI (alle Zellkerne) und CD11b-Färbung.

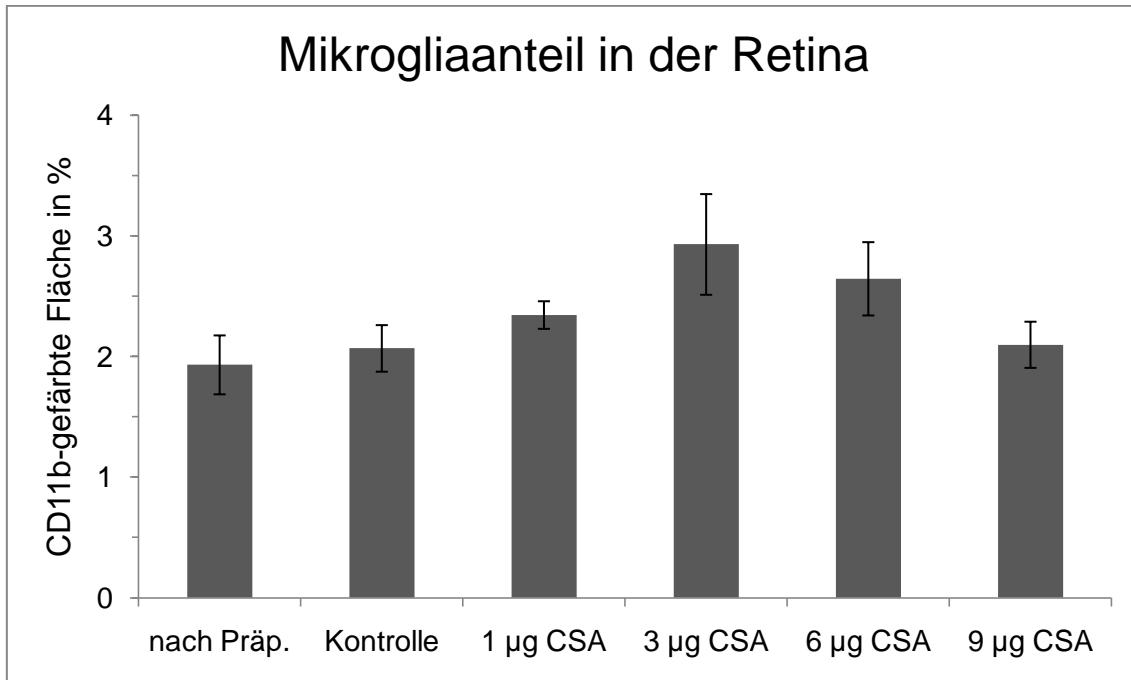


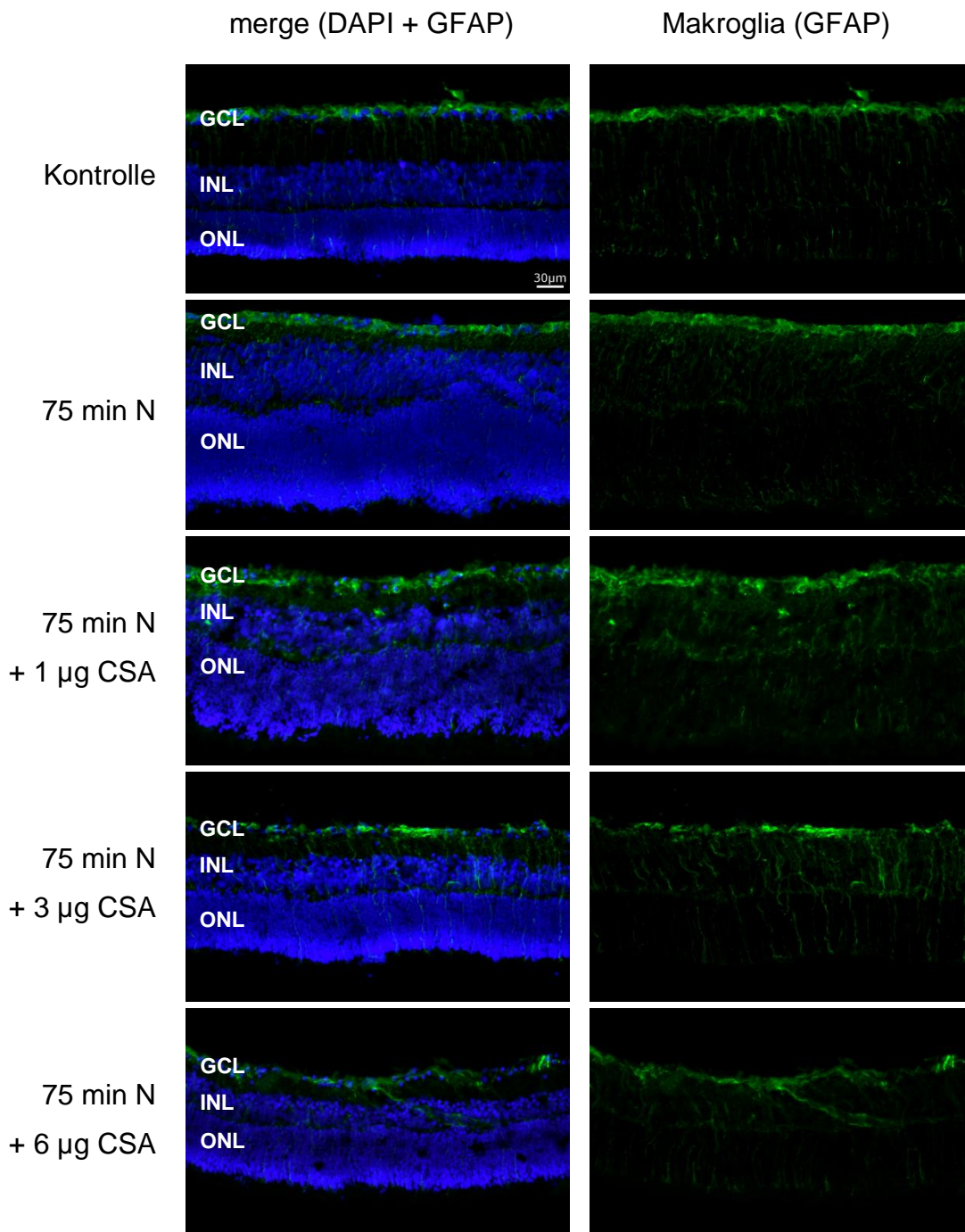
Abb. 27 Mikroglia in den CSA-behandelten Retinas: Dargestellt ist der prozentuale Anteil der gefärbten Fläche an der Gesamtfläche der Retina. Die vier verschiedenen CSA-Konzentrationen (1, 3, 6, 9 µg/ml) wurden nach 48 h ausgewertet. Der Anteil an Mikroglia steigt bei allen Konzentrationen gegenüber den Kontrollen und den Retinas direkt nach Präparation. Bei der Konzentration 9 µg/ml entspricht der Anteil nahezu den Kontrollen. Die Balken und Fehlerindikatoren geben Mittelwerte und Standardfehler an.

Auch die Untersuchung der Mikroglia gibt kein richtungsweisendes Ergebnis. Werden die Retinas mit 3 µg/ml CSA im Medium behandelt steigt der Anteil an Mikroglia am deutlichsten (um 1%) gegenüber den Retinas, die direkt nach der Präparation ausgewertet wurden. Bei 1 µg/ml CSA beträgt der Wert 2,34 %, bei 6 µg/ml CSA 2,64 % und bei 9 µg/ml CSA 2,1 %. Die CSA-Konzentrationen 1, 3 und 6 µg/ml verursachen eine Zunahme der gefärbten Fläche, wohingegen bei 9 µg/ml CSA der Mikrogliaanteil dem der Kontrollen (2,07 %) entspricht.

Die Schnitte der Retinas, die nach Glutamatstress mit CSA therapiert wurden, wurden nicht gefärbt. Betrachtet man die bisherigen Ergebnisse, ist nicht davon auszugehen, dass diese Schnitte aufschlussreiche Erkenntnisse erbringen würden. Außerdem zeigte der Glutamatstress keine Auswirkung auf die Gliareaktion. Somit ist die Testung einer Therapie an diesen Schnitten wenig aussagekräftig.

3.7 CSA und Ischämie

3.7.1 Makrogliareaktion nach CSA und Ischämie



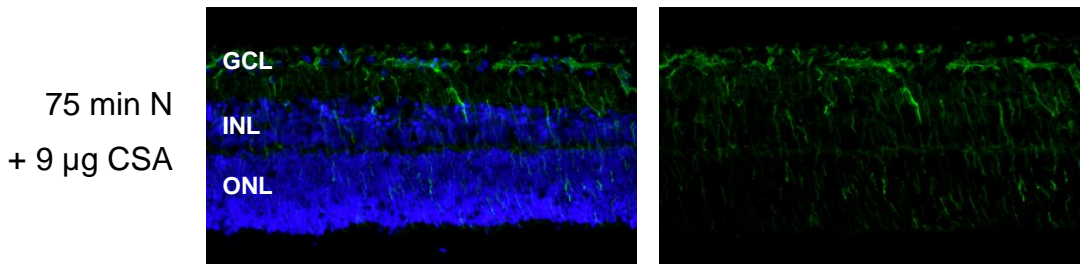


Abb. 28 Immunhistochemische Färbung (GFAP) der Ischämie- und CSA-behandelten Retinas: Repräsentative Färbung der Retinas, die 48 h kultiviert (außer Retinas direkt nach Präparation), 75 min. Ischämie-behandelt und mit CSA in verschiedenen Konzentrationen behandelt wurden (1 µg, 3 µg, 6 µg, 9 µg). Auf den Fotos ist ein Querschnitt der Retina in 200-facher Vergrößerung dargestellt. Rechts die Makroglia mithilfe des GFAP-Antikörpers markiert, links ein *merge* aus DAPI (alle Zellkerne) und

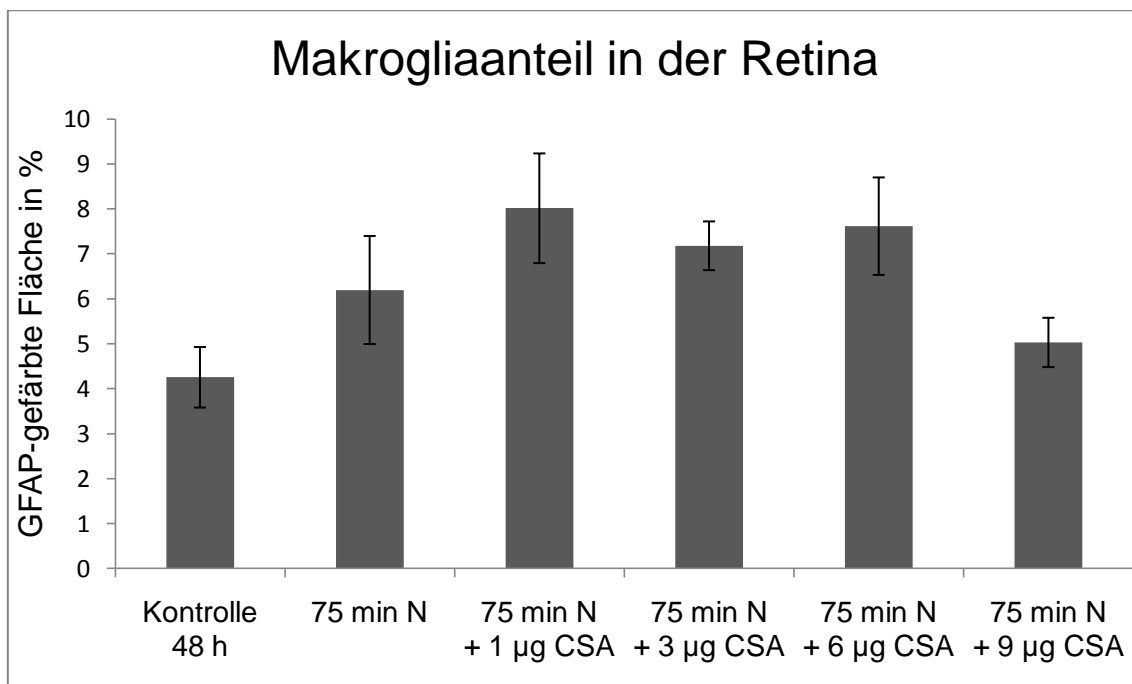
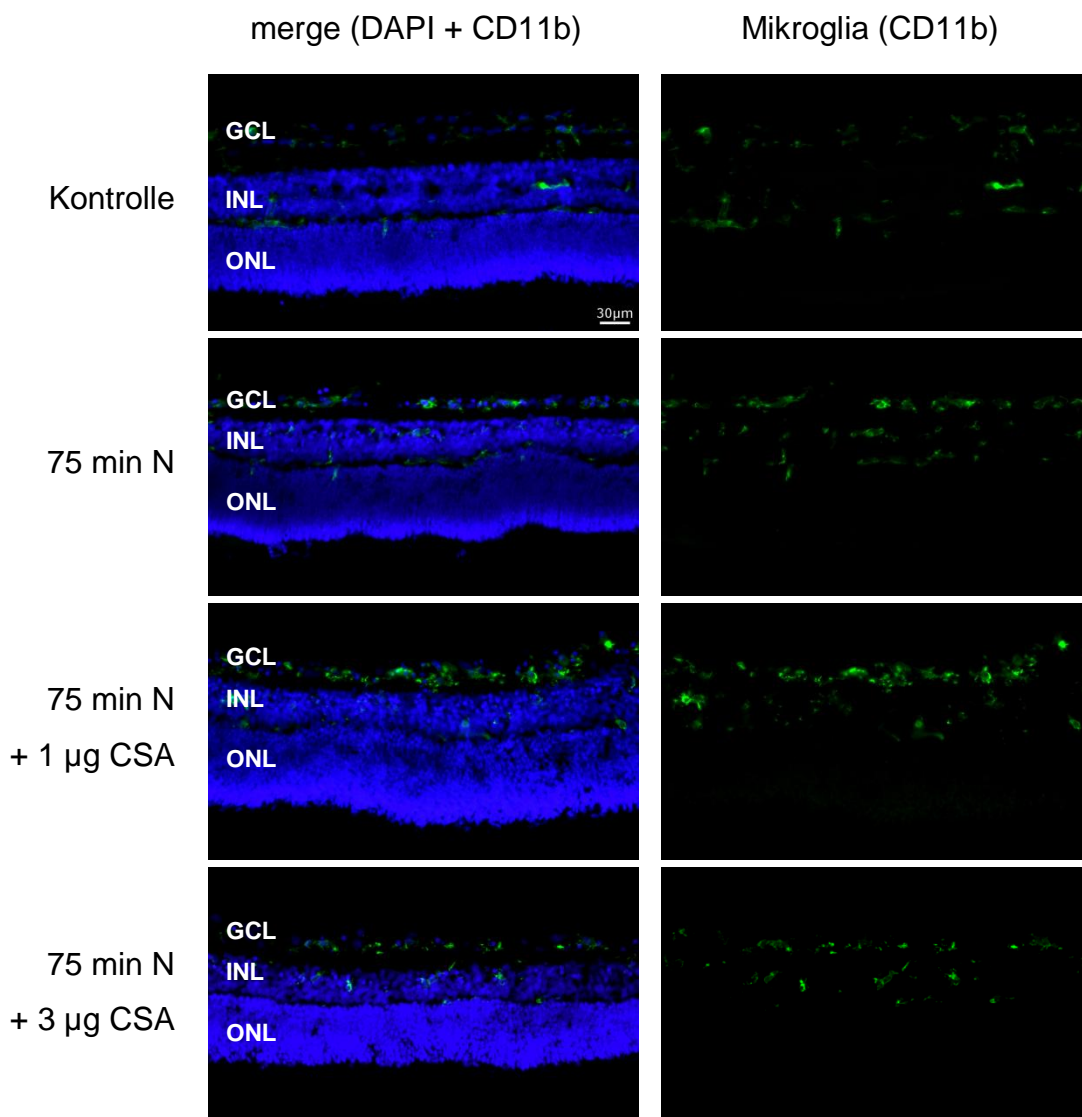


Abb. 29 Makroglia in den Ischämie- und CSA-behandelten Retinas: Der Anteil der gefärbten Fläche an der Gesamtfläche kann dem Diagramm in Prozent entnommen werden. Der Versuch wurde nach 48 Stunden beendet. Die Retinas wurden 75 min. Ischämie-behandelt. Es wurden vier CSA-Konzentrationen angewendet (1 µg/ml, 3 µg/ml, 6 µg/ml, 9 µg/ml). Der Anteil der Makroglia ist bei allen CSA-Konzentrationen höher als bei der reinen Ischämie außer bei 9 µg/ml. Hier liegt der Wert unter dem der 75 minütigen Ischämie. Die Ergebnisse der CSA Versuche lassen keine verallgemeinernde Aussage zu, ob CSA eine Aktivierung der Makroglia verhindert oder initiiert. Geringere Konzentrationen scheinen die Gliose zu verstärken, eine hohe Konzentration von 9 µg/ml hält die Gliose auf dem Niveau der reinen Ischämie.

Die Explantate wurden die ersten 24 Stunden mit verschiedenen CSA-Konzentrationen im Medium (1, 3, 6, 9 µg/ml) kultiviert und währenddessen 75

Minuten in der Ischämiekammer begast. Anschließend wurde weitere 24 Stunden mit reinem Medium kultiviert und nach insgesamt 48 Stunden ausgewertet. Unter reiner Ischämie nimmt die Makroglia um ca. 2 % im Vergleich zu den Kontrollen (4,26 %) zu. Die Behandlung mit CSA in den drei geringeren Konzentrationen (1, 3, 6 µg/ml) zeigen keinen positiven Effekt zur Reduzierung der Gliose. Bei einer Konzentration von 9 µg/ml CSA sinkt der Anteil, trotz 75minütiger Ischämie, auf 5,03 % gegenüber der reinen Ischämie. Dieser Abfall ist jedoch nicht signifikant.

3.7.2 Mikrogliareaktion nach CSA und Ischämie



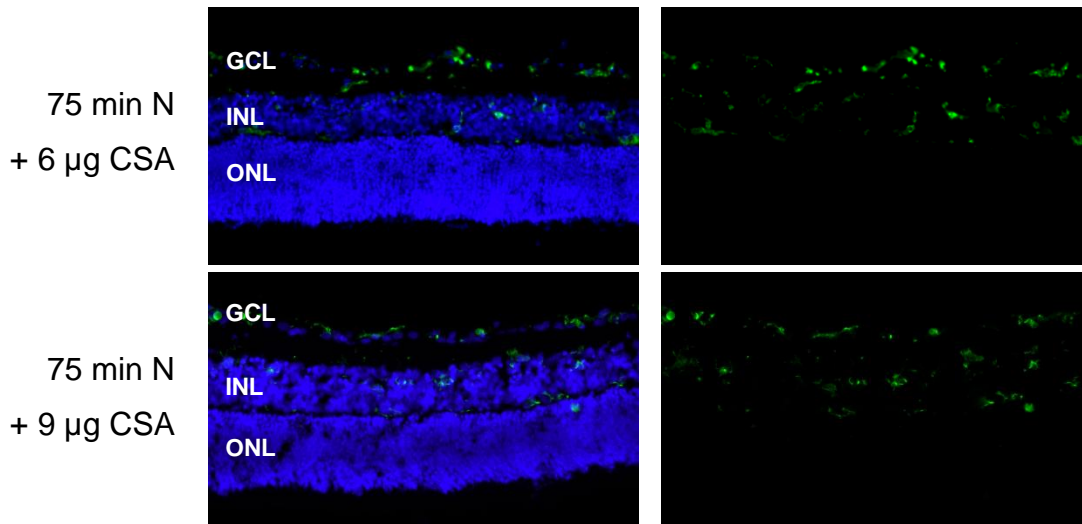


Abb. 30 Immunhistochemische Färbung (CD11b) der Ischämie- und CSA-behandelten Retinas: Repräsentative Färbung der Retinas, die 48 h kultiviert (außer Retinas direkt nach Präparation), 75 min. Ischämie-behandelt und mit CSA in verschiedenen Konzentrationen behandelt wurden (1, 3, 6, 9 µg/ml). Auf den Fotos ist ein Querschnitt der Retina in 200-facher Vergrößerung dargestellt. Rechts die Mikroglia mithilfe des CD11b-Antikörpers markiert, links ein *merge* aus DAPI (alle Zellkerne) und CD11b-Färbung.

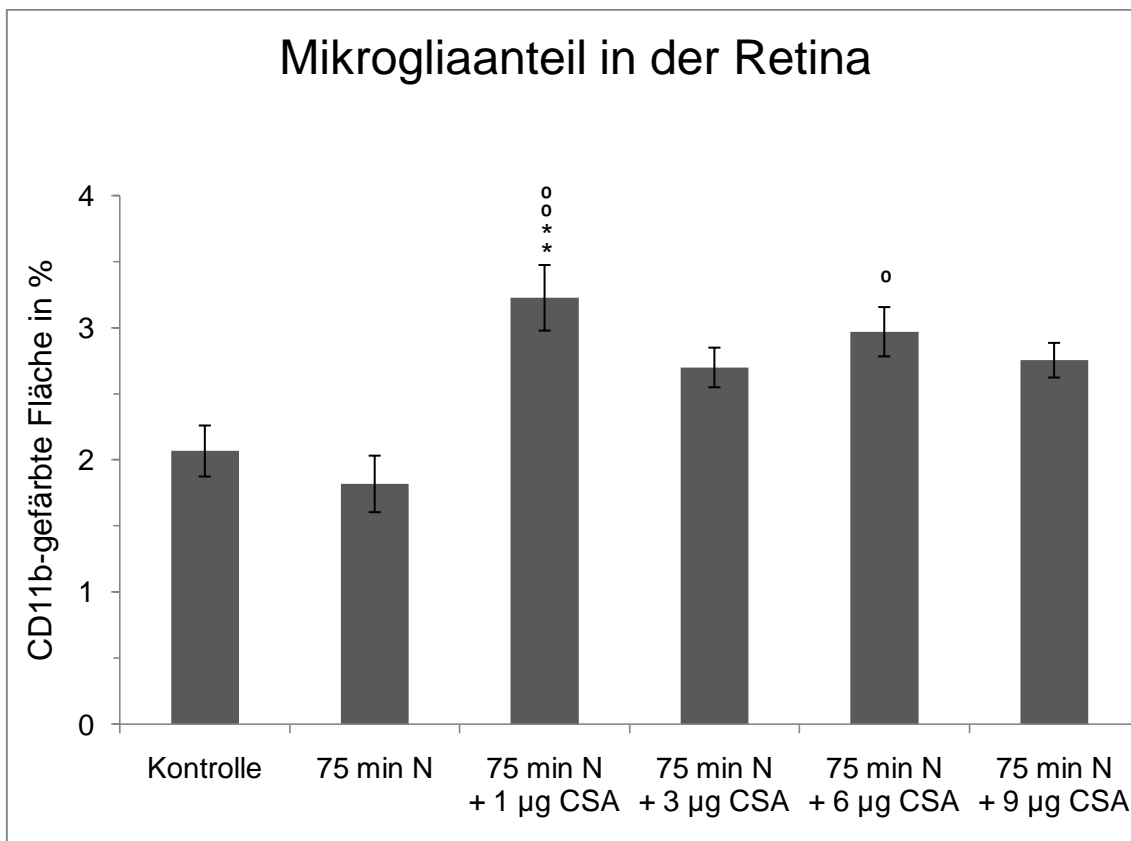


Abb. 31 Mikroglia in den Ischämie- und CSA-behandelten Retinas: Abgebildet ist der prozentuale Anteil der gefärbten Fläche an der Gesamtfläche der Retina. Die Auswertung erfolgte nach 48 h nach 75 minütiger Ischämiebehandlung und Verwendung vier

verschiedener CSA-Konzentrationen (1, 3, 6, 9 µg/ml). Der Anteil an Mikroglia liegt mit ca. 2,5 bis 3,25 % bei den CSA-behandelten Retinas höher als bei den Kontrollen (ca. 2 %) und reiner Ischämie (ca. 1,8 %). Die Werte der Konzentrationen 1 und 6 µg/ml unterscheiden sich signifikant von dem der reinen Ischämie. Die Ergebnisse sprechen für einen aktivierenden Effekt von CSA auf die Mikroglia. Die statistische Signifikanz ist durch * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ gegenüber den Kontrollen und ° $p < 0,05$, °° $p < 0,01$, °°° $p < 0,001$ gegenüber reiner Ischämie-Behandlung angegeben.

Unter 75 Minuten Ischämie ohne CSA-Zusatz ist, im Vergleich zu den Kontrollen, nach 48 Stunden weniger Mikroglia vorhanden (Kontrolle: 2,07 %, 75 min N: 1,82 %). Alle vier CSA-Konzentrationen steigern den Anteil der Mikroglia. Bei 1 µg/ml CSA im Medium liegt der Wert (3,23 %) signifikant über dem der reinen Ischämie ($p < 0,01$) und dem der Kontrollen ($p < 0,01$). Die Konzentration von 6 µg/ml lässt den Mikrogliaanteil (2,97 %) ebenfalls signifikant über die 75minütige Ischämie ($p < 0,05$) steigen. Das Ergebnis gibt keinen Anlass zur Annahme eines reduzierenden Effekts der Mikrogliose durch CSA-Behandlung.

4 Diskussion

4.1 Die Gliazellen in der Gewebekultur

Die Gewebekultur ermöglicht es, einen ganzen Zellverbund und damit die unmittelbare Umgebung der Zellen möglichst unverändert zu bewahren (Blak 2015). Jedoch kann sie die Situation und die Gegebenheiten *in vivo* nicht 100%ig abbilden. So stellt bereits die Axotomie und die Präparation ein Trauma dar, welches zu Zellschäden, zum Zelluntergang und daraus folgend zur Abnahme der retinalen Ganglienzellen führt (Garcia-Valenzulela, Gorczyca et al. 1994).

Die *in vitro* Bedingungen haben ebenfalls Auswirkungen auf die Gliazellen. Die Kultivierung an sich und die damit einhergehenden Veränderungen der Umgebung führen zur spontanen Aktivierung der Gliazellen. In einer Studie wurde nachgewiesen, dass die ruhende Mikroglia in einer Zellkultur vorübergehend zu einer amöboiden Form übergeht und proliferiert. Nach zwei Tagen war der Höhepunkt der Anzahl an aktivierter Mikroglia festzustellen und nach sechs Tagen *in vitro* nahmen sie wieder ihre verästelte ruhende Form an. Die Dichte an Mikroglia war nach zwei Tagen *in vitro* (820.0 Mikroglia/mm²) signifikant höher als bei *in situ* Präparationen (315.1 Mikroglia/mm²) (Mertsch, Hanisch et al. 2001).

Die Kontrollen und die Retinas direkt nach Präparation blieben in unseren Versuchen unbehandelt. Und trotzdem waren aktivierte Gliazellen nachweisbar. Der Anteil an aktivierter Makroglia liegt laut den Ergebniswerten bei den Retinas direkt nach Präparation bei 2,33 %, bei der Kontrolle nach 24 Stunden Kultivierung bei 4,45 %, bei der Kontrolle nach 48 Stunden Kultivierung bei 4,26 % und bei der Kontrolle nach 72 Stunden Kultivierung sogar bei 7,68 % (Abb. 11).

Desweiteren war auch aktivierte Mikroglia nachweisbar. Bei den Retinas direkt nach Präparation 1,93 %, bei den Kontrollen nach 48 Stunden 2,07 % (Abb. 13).

In inaktiven Müllerzellen wurde bis jetzt kein GFAP entdeckt. Es wird in Müllerzellen erst nach Schädigung, Trauma oder pathologischen Einflüssen auf die Retina exprimiert (Björklund, Bignami et al. 1985). Das bestätigt die Annahme, dass die Präparation und die Kultivierung an sich einen Einfluss auf die Gliazellaktivierung haben. Wakakuras Immunofluoreszenzstudien stellten 70 bis 90 Prozent der kultivierten Müllerzellen als GFAP positiv dar (Wakakura and Foulds 1988). Es werden allerdings auch Studien beschrieben, die schlussfolgern, dass durch die Konditionen der Kultivierung keine generelle Müllerzellgliose hervorgerufen wird. Kuhrt et al. stellten bei ihren Organkulturen (Rattenretinas) nach drei Tagen Kultivierung keine stark erhöhte GFAP Expression fest (Kuhrt, Wurm et al. 2008). Dies entspricht einer Arbeit von Enzmann et al. mit Kaninchenretinas, in der die Retinakulturen bis sieben Tage *in vitro* GFAP negativ blieben (Enzmann, Germer et al. 2000).

Die Erkenntnis, dass bereits bei den Kontrollen und den Retinas direkt nach Präparation aktivierte Makroglia nachweisbar ist und die Vermutung, dass immer aktivierte Mikroglia vorhanden ist, muss bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Deshalb stellt die nötige Axotomie der Ganglienzellen einen Nachteil des *in vitro* Modells dar. Andererseits bietet die Kultivierung von Retinaexplantaten einige Vorteile gegenüber *in vivo* Versuchen. *In vitro* Experimente sind nicht nur günstiger und einfacher durchzuführen sondern bedeuten auch erheblich weniger Stress und Leiden für die Versuchstiere. Außerdem kann an den Gewebekulturen eine große Anzahl an verschiedenen Versuchen durchgeführt werden. Es können mehr Gewebeproben hergestellt und ausgewertet und Wirkstoffwirkungen langfristig beobachtet werden (Blak 2015).

4.2 Die Glutamat Versuche

Die neurotoxische Wirkung von Glutamat ist bereits bekannt. Ein erhöhter extrazellulärer Glutamatspiegel in der Retina hat Exzitotoxizität zur Folge. Durch die Überaktivierung von Glutamatrezeptoren, v.a. des N-Methyl-D-Aspartat Rezeptors, an retinalen Neuronen kommt es zum Kalziumeinstrom in die Zelle. Dieser Kalziumeinstrom induziert über eine Kaskade letztendlich die Apoptose (Sucher, Lipton et al. 1997, Lang 2013). Es existiert eine Reihe an Krankheiten des ZNS, bei denen die endogenen Exzitotoxine ihren Teil zur Neurodegeneration beitragen. Zu diesen Erkrankungen gehören neben chronisch degenerativen Erkrankungen wie Parkinson, Alzheimer und Glaukom auch akute ischämische Zustände (Hirnfarkt, ZAV). Rothman belegte als erster 1984, dass der Grund für den Zelltod von kultivierten Neuronen unter ischämischen Bedingungen die Überaktivierung der Glutamatrezeptoren ist (Romano, Chen et al. 1998). Die durchgeführten Versuche mit den verschiedenen Glutamatkonzentrationen sollten eine zuverlässige Vergleichsmöglichkeit darstellen, um die Toxizität der neu entwickelten Methode zur Erzeugung einer Ischämie *in vitro* belegen zu können.

Matthias Blak konnte die toxische Wirkung von Glutamat auf retinale Ganglienzellen an den verwendeten Retinakulturen bestätigen. Die Ergebnisse seiner Versuche legen dar, dass die Ganglienzellzahl bei Glutamatbehandlung sinkt. Dabei führten höhere Konzentrationen zu größeren Zellverlusten. Des Weiteren stieg die Zahl der apoptotischen Zellen unter Behandlung mit Glutamat (Blak 2015).

Zu den Hauptmerkmalen der Neurodegeneration der Retina zählt nicht nur die Apoptose von retinalen Zellen sondern auch die Gliazellaktivierung (Lindemann 2013). Da durch die neurotoxische Wirkung des Glutamats Ganglienzellen zu Grunde gehen, wäre die Annahme, dass dadurch die Gliazellen der Retina aktiviert werden plausibel. Um dies zu überprüfen, wurden die Glutamat-behandelten Retinakulturen auf aktivierte Makroglia und Mikroglia untersucht. Weder die GFAP- noch die CD11b-Färbung ergaben aussagekräftige Ergebnisse. Entgegen den Erwartungen liegen die Werte der glutamat-behandelten Retinas unter den der Kontrollen (*Abb. 5, Abb. 7*). Die Ausprägung der Gliose

korreliert nicht mit der Ganglienzellzahl. Dies entspricht den Ergebnissen, die Patricia Klemm in ihren Versuchen gewann. Allerdings verwendete sie andere Methoden. Sie untersuchte unter anderem die mRNA Expression des GFAP- und CD11b-Gens nach der Behandlung der Retinaexplantate mit 1 mM Glutamat. Es wurde keine Veränderung der mRNA Expression der Gliazellmarker festgestellt (Klemm 2015).

Berichten zufolge kann Glutamat unter bestimmten Umständen einen neuroprotektiven Effekt haben. Werden Nervenzellen mit geringen Glutamatkonzentrationen (10^{-18} und 10^{-22} M) oder Glutamat Agonisten behandelt, tritt durch die Anpassung des Gewebes ein positiver Umkehreffekt auf, auch Hormesis genannt, der die Neuronen vor der Glutamat Exzitotoxizität schützt (Rocha, Martins et al. 1999, Jonas, Lin et al. 2001). Die Glutamatkonzentrationen, mit denen die Retinaexplantate in unseren Versuchen behandelt wurden, sind zu hoch um einen solchen Effekt auszulösen. Deshalb und weil Matthias Blak in seinen Versuchen einen signifikanten Abfall der Ganglienzellzahl nach Glutamatbehandlung feststellte, kann eine neuroprotektive Wirkung in unseren Experimenten ausgeschlossen werden.

Beim Vergleich der Glutamatergebnisse mit denen der Ischämie ermittelte Blak, dass der Verlust von retinalen Ganglienzellen nach der *in vitro* erzeugten Ischämie in etwa so groß ist, wie derjenige, der unter 1 mM Glutamat erzielt wurde. Somit stellt die Konzentration von 1 mM Glutamat einen geeigneten Vergleichsparameter für weitere Versuche dar (Blak 2015). Der Vergleich zwischen der Gliazellaktivierung nach Glutamatstress (1 mM) und der nach 75minütiger Ischämie (Auswertung nach 48 Stunden) ergab keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Kontrollen. Bei beiden Behandlungen fand also keine Aktivierung statt. Da die Ergebniswerte der Makro- und Mikrogliaanteile der Glutamatversuche nicht für eine Aktivierung der Gliazellen oder eine Toxizität von Glutamat sprechen, ist das Heranziehen dieser Werte als Vergleichsparameter wenig aussagekräftig.

4.3 Die Ischämie Versuche

Kommt es aufgrund eines ZAVs, eines Venenverschlusses oder infolge der diabetischen Retinopathie oder eines Glaukoms zur verminderten Durchblutung der Retina, wird diese nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt (Schmid, Renner et al. 2014). Um solch eine Ischämie zu simulieren, gibt es verschiedene Möglichkeiten und Modelle. Eine Vorgehensweise ist z.B. den intraokularen Druck zu erhöhen. Durch Einspritzen einer Lösung in den Bulbus kann der intraokulare Druck über den systolischen Blutdruck gesteigert und so eine Ischämie erzeugt werden (Larsen and Osborne 1996, Schmid, Renner et al. 2014). Eine andere Möglichkeit ist, durch Abklemmen der Karotiden und vertebraler Arterien den retinalen Blutfluss zu vermindern (Osborne, Block et al. 1991). Alternativ zu diesen *in vivo* Modellen existieren derzeit auch verschiedene tierschonendere *in vitro* Modelle zur Simulation einer Ischämie. Eine unkomplizierte Methode stellt die Kultivierung in einem Medium dar, das keinen Sauerstoff und keine Glukose beinhaltet. So stehen keine Substrate für die aerobe oder anaerobe Energiegewinnung zur Verfügung und somit kann der Energiemangel während einer Ischämie nachgestellt werden. Eine andere Methode stellt der Einsatz von chemischen Inhibitoren dar, die die Verwendung der vorhandenen Substrate einschränken. Durch die Hemmung bestimmter Enzyme kann gezielt in den Stoffwechsel eingegriffen und ausgewählte Stoffwechselwege blockiert werden. Der chemisch induzierte Zustand der Ischämie ist einfach und effektiv umsetzbar und führt schnell zum gewünschten Energiemangel. Allerdings muss die Tatsache, dass die Inhibitoren relativ unspezifisch sind, lang anhaltend wirken und das Auswaschen sehr schwierig ist, als Nachteil angesehen werden. Außerdem haben die chemischen Stoffe weitere komplizierte Auswirkungen, die nicht allein den Stoffwechsel betreffen (Romano, Chen et al. 1998). In dieser Hinsicht bietet die neu entwickelte Ischämiekammer einen wesentlichen Vorteil. Sie ermöglicht die Simulation einer Ischämie durch die Begasung mit Stickstoff auf eine einfache und kostengünstige Art und Weise. Hinzu kommt, dass die Dauer der Ischämie präzise bestimmt und kontrolliert werden kann. Daraus folgend können die Konsequenzen und das Potenzial der Geweberegeneration für die abgestuften Zeitintervalle genau evaluiert wer-

den. Ein weiterer Vorteil ist, dass bei dieser Methode der Erzeugung einer künstlichen Ischämie, Medikamente und Therapieansätze an den Retinakulturen getestet werden können.

Matthias Blak untersuchte in seinen Versuchen die Reaktion der Ganglienzellen nach einer Ischämie von 45, 60, 75, 90 und 120 Minuten. Histologisch ausgewertet wurden die Retinas nach 24, 48 und 72 Stunden. Er kam nicht nur zu dem Ergebnis, dass bei jeder Ischämiedauer eine Abnahme der Ganglienzellzahl sowie eine Zunahme der apoptotischen Ganglienzellen stattfindet, sondern auch, dass je länger die Ischämie dauert und je später ausgewertet wird desto größer der Ganglienzellverlust ist (Blak 2015). Patricia Klemm wies ebenfalls das Absterben der Ganglienzellen infolge einer Ischämie nach. Sie beobachtete eine reduzierte mRNA Expression bestimmter Ganglienzellmarker (Klemm 2015). Hiermit bestätigen beide den in weiterer Literatur beschriebenen aus einer Ischämie resultierenden Ganglienzelltod (Osborne, Ugarte et al. 1999, Goto, Ota et al. 2002, Kaur, Foulds et al. 2008, Kim, Braun et al. 2013).

Im Gegensatz zu den Reaktionen der Ganglienzellen konnte bei Betrachtung der Gliazellen nach der Behandlung in der Ischämiekammer keine signifikante Veränderung festgestellt werden. Die Versuche mit der Ischämiekammer von Patricia Klemm ergaben keine veränderte mRNA Expression der Gliazellmarker GFAP und CD11b (Klemm 2015). Dies entspricht weitestgehend den Ergebnissen meiner Versuche. Zwar kann eine Aktivierung der Makroglia nach Ischämie im Vergleich zu den Retinas direkt nach Präparation festgestellt werden, aber bezogen auf die Kontrollen haben nur die Retinas, die 120 Minuten Ischämie behandelt und nach 48 Stunden ausgewertet wurden, einen signifikant größeren Makrogliaanteil. Die Retinas, die 45 Minuten und 120 Minuten in der Ischämiekammer belassen und nach 48 Stunden ausgewertet wurden und die mit 90 und 120 Minuten Ischämie-Behandlung und Auswertung nach 72 Stunden haben signifikant mehr aktivierte Makroglia als die Retinas, die direkt nach der Präparation ausgewertet wurden. Die Retinas, bei denen die Auswertung schon nach 24 Stunden erfolgte, wiesen keine Unterschiede zu den Kontrollen auf (

Abb. 11). Insgesamt ist weder ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Ischämiedauer und der Makrogliareaktion noch zwischen dem Zeitpunkt der Auswertung und der Makrogliareaktion, wie es bei den Untersuchungen der Ganglienzellen der Fall war, festzustellen. Die Darstellung der Mikroglia ergab entgegen der Erwartung einer Zunahme mit zunehmender Ischämiedauer einen signifikanten Abfall des Mikrogliaanteils gegenüber den Kontrollen bei 60 Minuten Ischämie. Bei 45, 75, 90 und 120 Minuten hingegen sind keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen erkennbar (Abb. 13). Die simulierte Ischämie führt nicht zu einer Mikrogliose.

Studien zufolge allerdings kommt es in Folge einer Ischämie nach 24 Stunden oder innerhalb der ersten sieben Tage zur erhöhten GFAP Expression. Diese Beobachtung wurde an unterschiedlichen Modellen bestätigt, an Ratten-, Mäuse- und Schweinenetzhäuten. Die Ischämie wurde entweder durch die Erhöhung des intraokularen Drucks oder durch Abklemmen der Karotiden und vertebraler Arterien simuliert und 60 Minuten aufrecht erhalten. Eines haben diese Studien gemein. Die Ischämie wurde *in vivo* herbeigeführt und die Eukleation erfolgte erst Tage nach dem Ischämieereignis (Kuhrt, Wurm et al. 2008, Wurm, Landiev et al. 2011, Kim, Braun et al. 2013, Allen, Sayeed et al. 2014, Ji, Park et al. 2014). Da die *in vivo* Versuche einstimmig eine Müllerzellgliose mit einem Anstieg der GFAP Expression nach Ischämie darlegen, stellt sich die Frage, ob sich *in vitro* Ischämie Modelle überhaupt zur Untersuchung der Makrogliareaktion eignen.

Es gibt Unterschiede zwischen den *in vivo* und *in vitro* Modellen, die ein Grund sein könnten, warum die Ergebnisse von Patricia Klemm und unserer Ischämiekammerversuche der Literatur widersprechen. Ein Unterschied ist der fehlende Kontakt zu anderen Teilen des Auges wie dem Glaskörper oder dem retinalen Pigmentepithel. Deshalb kann das Zusammenspiel der Zellen der Retina mit anderen Zellen oder Strukturen des Organismus *in vitro* nie 100%ig wiedergegeben werden. Des Weiteren darf die Reperfusion, die in *in vivo* Experimenten stets der Ischämiephase folgt, nicht vernachlässigt werden. Denn die Reperfusion ist mit der Bildung von Sauerstoffradikalen, Entzündungsreaktionen und Glutamat Exzitotoxizität verbunden und trägt ihren Teil zur Netzhaut-

schädigung bei Ischämie bei (Wurm, Landiev et al. 2011, Kim, Braun et al. 2013). *In vitro* kann die Reperfusion nicht naturgetreu nachempfunden werden. Die Auswertung der oben genannten *in vivo* Studien erfolgte meist nach drei bis 21 Tagen. Unsere Versuche mit der Ischämiekammer wurden nach 24, 48 und 72 Stunden ausgewertet. Es sollte überprüft werden, ob unsere Kultivierungsdauer zu kurz war um die Gliareaktion zu beurteilen. Die Retinakulturen sollten in weiteren Versuchen länger im Medium nach Ischämie kultiviert werden und die Auswertung erst nach sieben oder 14 Tagen erfolgen. Kim et al. beschrieben in ihrer Arbeit von 2013, in der sie die Schädigung von Mäusenetzhäuten nach Ischämie/Reperfusion anhand der Genexpression untersuchten, eine erhöhte GFAP Expression nach drei Tagen. Die maximale Expression war nach 14 Tagen und nach 21 Tagen ging die GFAP Intensität wieder zurück (Kim, Braun et al. 2013).

Eine weitere Gemeinsamkeit der Ergebnisse einiger *in vivo* Studien ist, dass die GFAP Expression in den Kontrollen auf die retinale Ganglienzellschicht und die Nervenfaserschicht beschränkt ist. Dort befinden sich hauptsächlich die Astrozyten. Nach dem Ischämieereignis ist die GFAP Expression auch in Müllerzellen nachweisbar und somit nicht mehr auf die innersten Netzhautschichten beschränkt (Kim, Braun et al. 2013, Allen, Sayeed et al. 2014, Schmid, Renner et al. 2014). Bei Betrachtung der Bilder der immunhistochemischen Färbung stellt man fest, dass die GFAP Expression bei den Retinas, die direkt nach der Präparation ausgewertet wurden, weitestgehend auf die Ganglienzellschicht und die Nervenfaserschicht begrenzt ist. Die Kontrollen hingegen weisen eine GFAP Expression in Müllerzellen, die sich mit ihren Ausläufern durch alle Netzhautschichten erstrecken, im gesamten Querschnitt der Retina auf. Das ist ebenso der Fall bei den Ischämie-behandelten Retinas (alle Ischämiezeiten, 24, 48, 72 h) und spricht eindeutig für die Ausbildung einer reaktiven Gliose (Abb. 8, Abb. 9, Abb. 10). Allerdings kann nicht beurteilt werden, ob die Aktivierung der Gliazellen von der Ischämie herrührt, da die Kontrollen ebenfalls GFAP positiv sind. Das ist wie in 4.1 beschrieben höchstwahrscheinlich auf die Axotomie, die Präparation und die veränderten Bedingungen in Kultur zurückzuführen.

Schmid et al. und Hirrlinger et al. konnten in ihren Studien aktivierte Mikroglia und Makrophagen nach Ischämie in den inneren Netzhautschichten bis hin zur äußeren Körnerschicht darstellen. Allerdings verwendeten sie andere Marker wie Iba-1 und ED1+ (Hirrlinger, Ulbricht et al. 2010, Schmid, Renner et al. 2014). Unsere Bilder zeigen die Mikrogliazellen hauptsächlich in den inneren Schichten bis zur äußeren plexiformen Schicht. Jedoch ist in allen anderen Schichten ebenfalls Mikroglia anfärbbar (*Abb. 12*). Aufgrund der Tatsache, dass bei der immunhistochemischen Färbung nicht nur bei den Kontrollen CD11b-positive Mikroglia nachweisbar war, sondern ebenso bei den Retinas direkt nach Präparation, müssen Überlegungen angestellt werden, ob in weiteren Versuchen die Verwendung spezifischerer Marker für aktivierte Mikroglia eine Möglichkeit wäre das Ergebnis unserer bisherigen Experimente zu überprüfen. Alles in allem komme ich zu dem Schluss, dass die neu entwickelte Ischämiekammer eine adäquate Möglichkeit bietet, eine Ischämie *in vitro* zu simulieren und sich für die Untersuchung des Ganglienzellverlusts durchaus eignet. Bei der Betrachtung der Gliazellen und deren Reaktion auf eine Ischämie ergibt dieses Modell keine aussagekräftigen Ergebnisse und keine Korrelation zwischen der Glioseausbildung und der Ganglienzellzahl. Sie stellt keine gleichwertige Alternative zu den *in vivo* Modellen dar.

4.4 Hypothermie als Therapieansatz

Die Hypothermie wirkt bekanntermaßen neuroprotektiv. Sie wird in der Medizin bereits erfolgreich als Therapie bei ischämischen Ereignissen wie z.B. Herzstillstand oder Neonataler Hypoxie eingesetzt (Yenari and Hemmen 2010). Auch in Versuchen mit retinalen Ischämie-Modellen wird die neuroprotektive Wirkung bestätigt (Wang, Niwa et al. 2002, Salido, Dorfman et al. 2013). Diese Wirkung konnte auch von Matthias Blak in seiner Arbeit dargelegt werden. Die Behandlung mit Hypothermie hat einen positiven Effekt auf das Überleben der retinalen Ganglienzellen. Bei den Retinas, die mit Ischämie und Hypothermie (20 °C und 30 °C) behandelt wurden, waren signifikant mehr Ganglienzellen vorhanden als bei den nur Ischämie-behandelten Retinas. Der Unterschied der Ganglienzellzahl bei 20 °C und 30 °C war nicht signifikant (Blak 2015).

Aufbauend auf diese Ergebnisse war unser Ziel nun herauszufinden, ob die Hypothermie als Therapieansatz einen ebenso positiven Effekt auf die Gliazellreaktion hat. Die Retinas wurden vier Stunden Hypothermie-behandelt (30 °C, 20 °C, 10 °C) und nach 48 Stunden ausgewertet. Dieser Versuch diente dazu, eine toxische Wirkung der Hypothermie auf die Retinas auszuschließen. Keine der Temperaturen verringerte die Makrogliaaktivierung signifikant. Die Werte liegen auf Niveau der Kontrolle (*Abb. 15*). Die Hypothermie-Behandlung hat ebenfalls keine Minderung der Mikrogliareaktion zur Folge. Der Mikrogliaanteil liegt bei allen drei Temperaturen über dem der Kontrolle (nicht signifikant) und der Retinas direkt nach Präparation (*Abb. 17*). Die Hypothermie hat also auch keine toxische Wirkung.

Bei den Retinas, die 24 Stunden Glutamat-behandelt wurden, führt die zusätzliche vierstündige Hypothermietherapie zum Abfall des Makrogliaanteils. Bei einer Temperatur von 20 °C wurde fast halb so viel Fläche angefärbt als bei den Glutamat-behandelten Retinas ohne Hypothermie (*Abb. 19*).

Außerdem wurde die Wirkung der Hypothermie nach einem Ischämieereignis untersucht. Die Retinas wurden 75 Minuten mit Stickstoff begast und gleichzeitig vier Stunden bei 30 °C oder 20 °C kultiviert. Beide Temperaturen führen zu einem Abfall des Makrogliaanteils im Vergleich zu den Retinas, die nur Ischämie-gestresst wurden. Bei 20 °C ist der Abfall signifikant und der Wert der an-

gefärbten Fläche fällt unter den der Kontrollen (*Abb. 21*). Die Betrachtung der Mikroglia bringt keine signifikanten Unterschiede. Die Werte beider Temperaturen liegen auf dem Niveau der Kontrollen und der reinen Ischämie-Behandlung, sogar leicht darüber (*Abb. 23*).

Alles in allem deuten die Ergebnisse einen leicht hemmenden Effekt der Hypothermie auf die Müllerzellgliose an. Wohingegen die Mikrogliareaktion unbeeinflusst bleibt.

Klemms Untersuchungen der mRNA Expression ergaben Ergebnisse, die unseren entsprechen. Die GFAP Expression der Hypothermie-behandelten Retinas nahm signifikant ab, sowohl bei den sonst unbehandelten als auch bei den Ischämie-behandelten Retinaexplantaten. Die CD11b Expression jedoch zeigte keine signifikanten Unterschiede und wurde von der Hypothermie nicht beeinflusst (Klemm 2015). In einer Studie von 2013 an einem Mausmodell perinataler Asphyxie wurde ebenfalls dargelegt, dass eine Hypothermie von 15 °C die GFAP Expression in aktivierten Müllerzellen hemmt und somit einer Gliose vorbeugt (Rey-Funes, Dorfman et al. 2013).

Im Widerspruch zu unseren Mikroglia-Ergebnissen ist, einer Studie von 1997 zufolge, ein ischämisches Ereignis im Gehirn unter hypothermen Bedingungen (30 °C) nicht mit der Aktivierung von Mikroglia assoziiert wohingegen bei den Kontrollen bei 37 °C Mikrogliaaktivierung nachweisbar ist (Kumar and Evans 1997). Auch die Bildung von Entzündungsfaktoren, die den neuronalen Zelltod vermitteln und von aktivierten Mikrogliazellen produziert werden, sinkt schon bei einer milden Hypothermie von 35 °C und 33 °C (Matsui, Yoshida et al. 2014). Weitere Forschung muss klären, ob die Tatsache, dass Hypothermie eine Aktivierung von Mikroglia im Gehirn verhindert und so der neuronale Schaden reduziert werden kann (Si, Nakamura et al. 1997, Wang, Deng et al. 2002), auch auf die Retina, die ebenfalls zum ZNS gehört, übertragbar ist.

In der praktischen Anwendung wäre eine Erzeugung einer lokalen Hypothermie durch eine Spüllösung denkbar. So kann die Kühlung nicht nur während des Ischämieereignisses sondern auch nach der Reperfusion aufrecht erhalten werden (Blak 2015).

4.5 CSA als Therapieansatz

Einer Studie von Shiga et al. zufolge wirkt CSA protektiv gegen Ischämie/Reperfusionsschäden im Gehirn. Sowohl die Ausbildung des ischämischen Hirnödems als auch die Infarktgröße werden verringert (Shiga, Onodera et al. 1992). Kim et al. wiesen den neuroprotektiven Effekt von CSA ebenfalls in Bezug auf Ischämieschäden der Retina, die durch Erhöhung des intraokularen Drucks hervorgerufen wurden, nach. CSA fördert das Überleben der retinalen Ganglienzellen und verhindert den apoptotischen Zelltod (Kim, Shim et al. 2014). Es gibt ebenfalls Studien, die sich mit der Auswirkung von CSA auf Gliazellen beschäftigen. Rama Rao et al. kamen zu dem Schluss, dass CSA die Schwellung von Astrozyten infolge der Behandlung mit Ammoniak vollständig unterdrückt (Rama Rao, Chen et al. 2003) und Bambrick et al. bewiesen den protektiven Effekt von CSA auf Astrozyten (Bambrick, Chandrasekaran et al. 2006).

Die Versuche von Matthias Blak sollten die von Kim 2014 gezeigte neuroprotektive Wirkung von CSA auf retinale Ganglienzellen belegen. Dabei wurden CSA Konzentrationen zwischen 1 µg/ml und 9 µg/ml untersucht. Zuerst wurde nur CSA in das Medium gegeben und keine weitere Noxe eingesetzt. Im Gegensatz zu den Hypothermieergebnissen wies CSA hier keinen *rescue effect* auf. Die Ganglienzellzahl fiel leicht unter die der Kontrollen, jedoch nicht signifikant. CSA hat somit keinen toxischen Effekt. In weiteren Versuchen, in denen die Retinas einer 75minütigen Ischämie ausgesetzt wurden und zusätzlich in mit CSA versetztem Nährmedium kultiviert wurden, konnte für niedrige Konzentrationen (1 µg/ml bis 6 µg/ml) keine neuroprotektive Wirkung des CSA beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 9 µg/ml CSA hingegen überlebten 20 % mehr retinale Ganglienzellen als bei den unbehandelten Kontrollen (Blak 2015).

Patricia Klemm beobachtete in ihren Versuchen, dass CSA die Retinaexplantate zwar vor einem Verlust an Dicke und spontaner Ganglienzellaktivität nach Ischämie schützt, aber im Gegensatz zur Hypothermie keinen neuroprotektiven Effekt auf die retinalen Ganglienzellen hat. Durch die vermin-

derte TUBB3 Protein Expression bei einer Konzentration von 9 µg/ml CSA vermutet sie sogar eine neurotoxische Wirkung (Klemm 2015).

In einer Studie vom Jahre 2002 wird von einer toxischen Wirkung des CSA berichtet, in der bereits ähnliche Konzentrationen zur Apoptose der Nervenzellen führen (McDonald, Goldberg et al. 1996, Kaminska, Figiel et al. 2001). Die CSA Konzentrationen, die sich als toxisch für die Neuronen erwiesen, hatten keine Auswirkungen auf die Astrozyten (Kaminska, Figiel et al. 2001). Höhere Dosen CSA (>50 µg/ml) führten jedoch in Experimenten von Pyrzynska et al. zu morphologischen Veränderungen von reaktiven Astrozyten bis hin zum Zelltod (Pyrzynska, Lis et al. 2001).

Bei Betrachtung der GFAP mRNA Expression ergaben Klemms Versuche eine erhöhte GFAP Expression bei den nur CSA-behandelten Retinaexplantaten aber keine Veränderungen durch CSA Behandlung nach retinaler Ischämie (Klemm 2015).

Anhand meiner Versuche kann keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob CSA einen positiven oder negativen Effekt auf die Retinas bezüglich der Makroglia hat. Bei den Retinaexplantaten, die nur mit den vier verschiedenen Konzentrationen an CSA behandelt wurden, liegt der Makrogliaanteil bei allen Konzentrationen auf Höhe der Kontrolle. Nur der Wert bei 6 µg/ml steigt signifikant im Vergleich zur Kontrolle und zu den Retinas direkt nach Präparation und weist auf eine Aktivierung der Makroglia hin (*Abb. 25*). Die Ergebnisse lassen keine verallgemeinernde Feststellung zu, ob CSA eine Aktivierung der Müllerzellen und Astrozyten verhindert oder initiiert. Die Bilder der immunhistochemischen Färbung jedoch zeigen GFAP-positive Fortsätze der Müllerzellen, die die gesamte Retina durchspannen (*Abb. 24*), was auf eine reaktive Gliose hinweist. Der Makrogliaanteil der Retinas, die zusätzlich für 75 Minuten in der Ischämiekammer mit Stickstoff begast wurden, liegt bei keiner Konzentration signifikant über dem der Kontrollen. Zu den rein Ischämie-behandelten Retinaexplantaten gibt es ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (*Abb. 29*). Betrachtet man meine Ergebnisse verringert CSA die Müllerzellaktivierung also nicht nach Ischämienstress. Auch Patricia Klemm beobachtete keine Veränderung der GFAP Expression.

Die Ergebnisse der Mikrogliauntersuchungen ergaben keine Hemmung der Mikrogliose und sprechen bei den zusätzlich Ischämie-behandelten Retinas für eine aktivierende Auswirkung des CSA auf die Mikroglia (*Abb. 31*). Dies widerspricht Klemms Erkenntnissen. Eine Konzentration von 9 µg/ml CSA verringerte die CD11b mRNA Expression um die Hälfte bei den sonst unbehandelten Retinas. Bei den zusätzlich Ischämie-behandelten rief die CSA-Behandlung keine Veränderungen in der CD11b mRNA Expression hervor (Klemm 2015).

5 Zusammenfassung

Beim ZAV handelt es sich um eine ophthalmologische Notfallsituation. Der Patient erleidet innerhalb weniger Stunden einen irreversiblen Sehverlust. Eine Therapie gibt es derzeit nicht. Die neue Methode zur Erzeugung einer Ischämie *in vitro* mit Hilfe der Ischämiekammer ermöglicht es, einen ZAV nachzustellen und neue Therapieformen an Retinakulturen zu untersuchen. Sie wurde bereits von Matthias Blak erfolgreich in Bezug auf die retinalen Ganglienzellen getestet. Ziel dieser Arbeit war, die Auswirkungen einer Ischämie auf die Gliazellen der Retina zu untersuchen und zwei Therapieansätze zu testen. Dazu wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt.

Eine Schwäche des *in vitro* Ischämie Modells ist die Tatsache, dass bereits die Axotomie einen Reiz darstellt, der Makro- und Mikroglia aktiviert.

Die Glutamatversuche ergaben Ergebniswerte, die nicht für eine Aktivierung der Gliazellen oder eine Toxizität von Glutamat sprechen.

Bei den Ischämieversuchen war kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Ischämiedauer oder dem Zeitpunkt der Auswertung und der Gliareaktion festzustellen. Signifikant mehr aktivierte Makroglia wurde nur bei einer Ischämiedauer von 120 Minuten beobachtet (Auswertung nach 48 Stunden). Der Mikrogliaanteil fiel signifikant bei 60 Minuten Ischämie.

Anhand des Ischämie Modells wurden zwei Therapieansätze getestet. Zum einen die Hypothermie (10 °C, 20 °C, 30 °C) und zum anderen das Medikament CSA. Die Hypothermie-Behandlung (20 °C) während und nach einer 75minütigen Ischämie führte zur signifikant geringer ausgeprägten Müllerzellgliose. Die Mikroglia reaktion blieb unbeeinflusst.

Eine CSA-Behandlung zeigte keine Verminderung der Müllerzellaktivierung nach Ischämie stress. Die Werte der Mikroglia untersuchungen sprechen für einen aktivierenden Effekt des CSA auf die Mikroglia.

Die *in vitro* Simulation einer Ischämie mit der neu entwickelten Ischämiekammer mag sich für die Untersuchung der retinalen Ganglienzellen eignen. In Bezug auf die Gliazellen stellt sie aber keine zuverlässige Methode dar. Es ist keine Korrelation zwischen dem Überleben der retinalen Ganglienzellen und der Ausprägung der Gliose erkennbar.

6 Literaturverzeichnis

Aiello, L., J. M. Northrup, B. A. Keyt, H. Takagi and M. A. Iwamoto (1995). "HYpoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells." Archives of Ophthalmology **113**(12): 1538-1544.

Allen, R. S., I. Sayeed, H. A. Cale, K. C. Morrison, J. H. Boatright, M. T. Pardue and D. G. Stein (2014). "Severity of middle cerebral artery occlusion determines retinal deficits in rats." Experimental Neurology **254**: 206-215.

Alt, A., R. D. Hilgers, A. Tura, K. Nassar, T. Schneider, A. Hueber, K. Januschowski, S. Grisanti, J. Luke and M. Luke (2013). "The neuroprotective potential of Rho-kinase inhibition in promoting cell survival and reducing reactive gliosis in response to hypoxia in isolated bovine retina." Cell Physiol Biochem **32**(1): 218-234.

Amin, R. H., R. N. Frank, A. Kennedy, D. Elliott, J. E. Puklin and G. W. Abrams (1997). "Vascular endothelial growth factor is present in glial cells of the retina and optic nerve of human subjects with nonproliferative diabetic retinopathy." Investigative Ophthalmology & Visual Science **38**(1): 36-47.

Atebara, N. H., G. C. Brown and J. Cater (1995). "Efficacy of Anterior Chamber Paracentesis and Carbogen in Treating Acute Nonarteritic Central Retinal Artery Occlusion." Ophthalmology **102**(12): 2029-2035.

Bambrick, L. L., K. Chandrasekaran, Z. Mehrabian, C. Wright, K. B. Krueger and G. Fiskum (2006). "Cyclosporin a Increases Mitochondrial Calcium Uptake Capacity in Cortical Astrocytes but not Cerebellar Granule Neurons." Journal of Bioenergetics and Biomembranes **38**(1): 43-47.

Barron, K. D. (1995). "The microglial cell. A historical review." Journal of the Neurological Sciences **134, Supplement**: 57-68.

Beatty, S. and K. G. Au Eong (2000). "Local intra-arterial fibrinolysis for acute occlusion of the central retinal artery: a meta-analysis of the published data." Br J Ophthalmol **84**(8): 914-916.

Björklund, H., A. Bignami and D. Dahl (1985). "Immunohistochemical demonstration of glial fibrillary acidic protein in normal rat Müller glia and retinal astrocytes." Neuroscience Letters **54**(2-3): 363-368.

Blair, N. P., D. S. Baker, J. Rhode and M. Solomon (1989). "Vitreoperfusion: A new approach to ocular ischemia." Archives of Ophthalmology **107**(3): 417-423.

Blak, M. W. (2015) "Evaluation der neuroprotektiven Wirkung von Cyclosporin A und Hypothermie mithilfe eines neuen in vitro Ischämie-Modells."

Bringmann, A., M. Francke, T. Pannicke, B. Biedermann, H. Kodal, F. Faude, W. Reichelt and A. Reichenbach (2000). "Role of Glial K Channels in Ontogeny." *Glia* **29**: 35-44.

Bringmann, A., T. Pannicke, J. Grosche, M. Francke, P. Wiedemann, S. N. Skatchkov, N. N. Osborne and A. Reichenbach (2006). "Müller cells in the healthy and diseased retina." *Progress in Retinal and Eye Research* **25**(4): 397-424.

Bringmann, A. and A. Reichenbach (2001). "Role of Muller cells in retinal degenerations." *Front Biosci* **6**: E72-E92.

Bringmann, A., A. Reichenbach and P. Wiedemann (2004). "Pathomechanisms of Cystoid Macular Edema." *Ophthalmic Research* **36**(5): 241-249.

Bunt-Milam, A. H. and J. C. Saari (1983). "Immunocytochemical localization of two retinoid-binding proteins in vertebrate retina." *The Journal of Cell Biology* **97**(3): 703-712.

Chen, C. S., A. W. Lee, B. Campbell, T. Lee, M. Paine, C. Fraser, J. Grigg and R. Markus (2011). "Efficacy of Intravenous Tissue-Type Plasminogen Activator in Central Retinal Artery Occlusion Report From a Randomized, Controlled Trial." *Stroke* **42**(8): 2229-2234.

Chen, L., P. Yang and A. Kijlstra (2002). "Distribution, markers, and functions of retinal microglia." *Ocular Immunology and Inflammation* **10**(1): 27-39.

Cuadros, M. A. and J. Navascués (1998). "The origin and differentiation of microglial cells during development." *Progress in Neurobiology* **56**(2): 173-189.

Dahl, D. (1979). "The radial glia of Müller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein." *Experimental Eye Research* **28**(1): 63-69.

de Hoz, R., B. Rojas, A. I. Ramirez, J. J. Salazar, B. I. Gallego, A. Trivino and J. M. Ramirez (2016). "Retinal Macroglial Responses in Health and Disease." *Biomed Res Int* **2016**: 2954721.

Dedania, V. and S. Bakri (2015). Novel pharmacotherapies in diabetic retinopathy.

Deutsch, T. A., J. S. Read, J. Ernest and T. K. Goldstick (1983). "Effects of oxygen and carbon dioxide on the retinal vasculature in humans." *Archives of Ophthalmology* **101**(8): 1278-1280.

Dubois-Dauphin, M., C. Poitry-Yamate, F. de Bilbao, A. K. Julliard, F. Jourdan and G. Donati (1999). "Early postnatal Müller cell death leads to retinal but not optic nerve degeneration in NSE-Hu-Bcl-2 transgenic mice." Neuroscience **95**(1): 9-21.

Dyer, M. A. and C. L. Cepko (2000). "Control of Müller glial cell proliferation and activation following retinal injury." Nat Neurosci **3**(9): 873-880.

Eglitis, M. A. and É. Mezey (1997). "Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**(8): 4080-4085.

Eisenfeld, A. J., A. H. Bunt-Milam and P. V. Sarthy (1984). "Müller cell expression of glial fibrillary acidic protein after genetic and experimental photoreceptor degeneration in the rat retina." Investigative Ophthalmology & Visual Science **25**(11): 1321-1328.

Enzmann, V., A. Germer, M. Francke, L. Kohen, P. Wiedemann and A. Reichenbach (2000). "Alterations of sensory retinal explants exposed to choroidal melanoma cells ex vivo." Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology **238**(12): 985-992.

Fawcett, J. W. and R. A. Asher (1999). "The glial scar and central nervous system repair." Brain Research Bulletin **49**(6): 377-391.

Fernandez-Bueno, I., M. T. Garcia-Gutierrez, G. K. Srivastava, M. J. Gayoso, J. M. Gonzalo-Orden and J. C. Pastor (2013). "Adalimumab (tumor necrosis factor-blocker) reduces the expression of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity increased by exogenous tumor necrosis factor alpha in an organotypic culture of porcine neuroretina." Mol Vis **19**: 894-903.

Fischer, A. J. and T. A. Reh (2001). "Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina." Nature neuroscience **4**(3): 247-252.

Fisher, S. K., P. A. Erickson, G. P. Lewis and D. H. Anderson (1991). "Intraretinal proliferation induced by retinal detachment." Investigative Ophthalmology & Visual Science **32**(6): 1739-1748.

Fisher, S. K. and G. P. Lewis (2003). "Müller cell and neuronal remodeling in retinal detachment and reattachment and their potential consequences for visual recovery: a review and reconsideration of recent data." Vision Research **43**(8): 887-897.

Francke, M., F. Faude, T. Pannicke, A. Bringmann, P. Eckstein, W. Reichelt, P. Wiedemann and A. Reichenbach (2001). "Electrophysiology of Rabbit Müller (Glial) Cells in Experimental Retinal Detachment and PVR." Investigative Ophthalmology & Visual Science **42**(5): 1072-1079.

Francke, M., F. Faude, T. Pannicke, O. Uckermann, M. Weick, H. Wolburg, P. Wiedemann, A. Reichenbach, S. Uhlmann and A. Bringmann (2005). "Glial cell-mediated spread of retinal degeneration during detachment: A hypothesis based upon studies in rabbits." Vision Research **45**(17): 2256-2267.

Frasson, M., S. Picaud, T. Léveillard, M. Simonutti, S. Mohand-Said, H. Dreyfus, D. Hicks and J. Sahel (1999). "Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Induces Histologic and Functional Protection of Rod Photoreceptors in the rd/rd Mouse." Investigative Ophthalmology & Visual Science **40**(11): 2724-2734.

Garcia-Valenzuela, E., S. Shareef, J. Walsh and S. C. Sharma (1995). "Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma." Experimental Eye Research **61**(1): 33-44.

Garcia-Valenzuela, E., W. Gorczyca, Z. Darzynkiewicz and S. C. Sharma (1994). "Apoptosis in adult retinal ganglion cells after axotomy." Journal of Neurobiology **25**(4): 431-438.

Gardner, T. W., D. A. Antonetti, A. J. Barber, K. F. LaNoue and S. W. Levison (2002). "Diabetic Retinopathy: More Than Meets the Eye." Survey of Ophthalmology **47**, **Supplement 2**: S253-S262.

Geller, S. F., G. P. Lewis and S. K. Fisher (2001). "FGFR1, Signaling, and AP-1 Expression after Retinal Detachment : Reactive Müller and RPE Cells ." Investigative Ophthalmology & Visual Science **42**(6): 1363-1369.

Goto, W., T. Ota, N. Morikawa, Y. Otori, H. Hara, K. Kawazu, N. Miyawaki and Y. Tano (2002). "Protective effects of timolol against the neuronal damage induced by glutamate and ischemia in the rat retina." Brain Research **958**(1): 10-19.

Guzyk, M. M., A. A. Tykhomyrov, V. S. Nedzvetsky, I. V. Prischepa, T. V. Grinenko, L. V. Yanitska and T. M. Kuchmerovska (2016). "Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Inhibitors Reduce Reactive Gliosis and Improve Angiostatin Levels in Retina of Diabetic Rats." Neurochem Res.

Hattenbach, L.-O., C. Kuhli-Hattenbach, I. Scharrer and H. Baatz (2008). "Intravenous Thrombolysis With Low-dose Recombinant Tissue Plasminogen Activator in Central Retinal Artery Occlusion." American Journal of Ophthalmology **146**(5): 700-706.e701.

Hayreh, S. S. (2011). "Acute retinal arterial occlusive disorders." Progress in Retinal and Eye Research **30**(5): 359-394.

Hayreh, S. S., M. B. Zimmerman, A. Kimura and A. Sanon (2004). "Central retinal artery occlusion.: Retinal survival time." Experimental Eye Research **78**(3): 723-736.

Hirrlinger, P. G., E. Ulbricht, I. Iandiev, A. Reichenbach and T. Pannicke (2010). "Alterations in protein expression and membrane properties during Müller cell gliosis in a murine model of transient retinal ischemia." Neuroscience Letters **472**(1): 73-78.

Jammalamadaka, A., P. Suwannat, S. K. Fisher, B. S. Manjunath, T. Höllner and G. Luna (2015). "Characterizing spatial distributions of astrocytes in the mammalian retina." Bioinformatics **31**(12): 2024-2031.

Ji, Y.-S., J.-W. Park, H. Heo, J.-S. Park and S.-W. Park (2014). "The Neuroprotective Effect of Carnosine (β -Alanyl-L-Histidine) on Retinal Ganglion Cell Following Ischemia-Reperfusion Injury." Current Eye Research **39**(6): 634-641.

Jonas, W., Y. Lin and F. Tortella (2001). "Neuroprotection from glutamate toxicity with ultra-low dose glutamate." NeuroReport **12**(2): 335-339.

Kaminska, B., I. Figiel, B. Pyrzynska, R. Czajkowski and G. Mosieniak (2001). "Treatment of hippocampal neurons with cyclosporin A results in calcium overload and apoptosis which are independent on NMDA receptor activation." British Journal of Pharmacology **133**(7): 997-1004.

Karlstetter, M., S. Ebert and T. Langmann (2010). "Microglia in the healthy and degenerating retina: Insights from novel mouse models." Immunobiology **215**(9-10): 685-691.

Karlstetter, M., R. Scholz, M. Rutar, W. T. Wong, J. M. Provis and T. Langmann (2015). "Retinal microglia: Just bystander or target for therapy?" Progress in Retinal and Eye Research **45**: 30-57.

Kaur, C., W. S. Foulds and E.-A. Ling (2008). "Hypoxia-ischemia and retinal ganglion cell damage." Clin Ophthalmol **2**(4): 879-889.

Kezic, J. M., V. Chrysostomou, I. A. Trounce, P. G. McMenamin and J. G. Crowston (2013). "Effect of Anterior Chamber Cannulation and Acute IOP Elevation on Retinal Macrophages in the Adult Mouse Retinal Macrophage Response to IOP Elevation." Investigative Ophthalmology & Visual Science **54**(4): 3028-3036.

Kim, B.-J., T. A. Braun, R. J. Wordinger and A. F. Clark (2013). "Progressive morphological changes and impaired retinal function associated with temporal regulation of gene expression after retinal ischemia/reperfusion injury in mice." Molecular Neurodegeneration **8**(1): 1-19.

Kim, B. J., T. A. Braun, R. J. Wordinger and A. F. Clark (2013). "Progressive morphological changes and impaired retinal function associated with temporal regulation of gene expression after retinal ischemia/reperfusion injury in mice." Mol Neurodegener **8**: 21.

Kim, J. H., M. Seo and K. Suk (2013). "Effects of therapeutic hypothermia on the glial proteome and phenotype." Curr Protein Pept Sci **14**(1): 51-60.

Kim, S. Y., M. S. Shim, K. Y. Kim, R. N. Weinreb, L. A. Wheeler and W. K. Ju (2014). "Inhibition of cyclophilin D by cyclosporin A promotes retinal ganglion cell survival by preventing mitochondrial alteration in ischemic injury." Cell Death Dis **5**: e1105.

Klemm, P. (2015). "Analysis of the neuroprotective effect of hypothermia and cyclosporine A in an ex-vivo retinal ischemia model"

Kohno, T., H. Inomata and Y. Taniguchi (1982). "Identification of microglia cell of the rat retina by light and electron microscopy." Japanese journal of ophthalmology **26**(1): 53-68.

Kreutzberg, G. W. (1996). "Microglia: a sensor for pathological events in the CNS." Trends in Neurosciences **19**(8): 312-318.

Kuhr, H., A. Wurm, A. Karl, I. Iandiev, P. Wiedemann, A. Reichenbach, A. Bringmann and T. Pannicke (2008). "Müller cell gliosis in retinal organ culture mimics gliotic alterations after ischemia in vivo." International Journal of Developmental Neuroscience **26**(7): 745-751.

Kumar, K. and A. T. Evans (1997). "Effect of hypothermia on microglial reaction in ischemic brain." NeuroReport **8**(4): 947-950.

Lam, T. T., J. M. K. Kwong and M. O. M. Tso (2003). "Early Glial Responses after Acute Elevated Intraocular Pressure in Rats." Investigative Ophthalmology & Visual Science **44**(2): 638-645.

Lang, G. E. (2013). "Mechanism retinaler Neurodegeneration als Folge von Diabetes mellitus." Klin Monatsbl Augenheilkd **230**(09): 929-931.

Langmann, T. (2007). "Microglia activation in retinal degeneration." Journal of Leukocyte Biology **81**(6): 1345-1351.

Larsen, A. K. and N. N. Osborne (1996). "Involvement of adenosine in retinal ischemia. Studies on the rat." Investigative Ophthalmology & Visual Science **37**(13): 2603-2611.

Lewis, G. P. and S. K. Fisher (2003). Up-Regulation of Glial Fibrillary Acidic Protein in Response to Retinal Injury: Its Potential Role in Glial Remodeling and

a Comparison to Vimentin Expression. International Review of Cytology, Academic Press. **Volume 230**: 263-290.

Lewis, G. P., B. Matsumoto and S. K. Fisher (1995). "Changes in the organization and expression of cytoskeletal proteins during retinal degeneration induced by retinal detachment." Investigative Ophthalmology & Visual Science **36**(12): 2404-2416.

Lieth, E., A. J. Barber, B. Xu, C. Dice, M. J. Ratz, D. Tanase and J. M. Strother (1998). "Glial reactivity and impaired glutamate metabolism in short-term experimental diabetic retinopathy. Penn State Retina Research Group." Diabetes **47**(5): 815-820.

Lieth, E., T. W. Gardner, A. J. Barber and D. A. Antonetti (2000). "Retinal neurodegeneration: early pathology in diabetes." Clinical & Experimental Ophthalmology **28**(1): 3-8.

Lindemann, I. (2013). "Diabetische Retinopathie – Neurodegeneration lange vor Mikroangiopathie." Klin Monatsbl Augenheilkd **230**(02): 96-97.

Liu, S., Z.-w. Li, R. N. Weinreb, G. Xu, J. D. Lindsey, C. Ye, W.-h. Yung, C.-P. Pang, D. S. C. Lam and C. K.-s. Leung (2012). "Tracking Retinal Microgliosis in Models of Retinal Ganglion Cell Damage. In Vivo Imaging of Microgliosis." Investigative Ophthalmology & Visual Science **53**(10): 6254-6262.

Lo, A. C. Y., T. T. Y. Woo, R. L. M. Wong and D. Wong (2011). "Apoptosis and Other Cell Death Mechanisms after Retinal Detachment: Implications for Photoreceptor Rescue." Ophthalmologica **226**(suppl 1)(Suppl. 1): 10-17.

Martínez-Fernández de la Cámara, C., L. Olivares-González, D. Hervás, D. Salom, J. M. Millán and R. Rodrigo (2014). "Infliximab reduces Zaprinas-induced retinal degeneration in cultures of porcine retina." Journal of Neuroinflammation **11**(1): 1-14.

Matsui, K., N. Hosoi and M. Tachibana (1999). "Active Role of Glutamate Uptake in the Synaptic Transmission from Retinal Nonspiking Neurons." The Journal of Neuroscience **19**(16): 6755-6766.

Matsui, T., Y. Yoshida, M. Yanagihara and H. Suenaga (2014). "Hypothermia at 35 degrees C reduces the time-dependent microglial production of pro-inflammatory and anti-inflammatory factors that mediate neuronal cell death." Neurocrit Care **20**(2): 301-310.

McAllister, I. L., S. Vijayasekaran, S. D. Chen and D.-Y. Yu (2009). "Effect of Triamcinolone Acetonide on Vascular Endothelial Growth Factor and Occludin Levels in Branch Retinal Vein Occlusion." American Journal of Ophthalmology **147**(5): 838-846.e832.

McDonald, J. W., M. P. Goldberg, B. J. Gwag, S.-I. Chi and D. W. Choi (1996). "Cyclosporine induces neuronal apoptosis and selective oligodendrocyte death in cortical cultures." Annals of Neurology **40**(5): 750-758.

Mertsch, K., U.-K. Hanisch, H. Kettenmann and J. Schnitzer (2001). "Characterization of microglial cells and their response to stimulation in an organotypic retinal culture system." The Journal of Comparative Neurology **431**(2): 217-227.

Mizutani, M., C. Gerhardinger and M. Lorenzi (1998). "Müller cell changes in human diabetic retinopathy." Diabetes **47**(3): 445-449.

Mueller, A. J., A. S. Neubauer, U. Schaller, A. Kampik and E. for the European Assessment Group for Lysis in the (2003). "EVALUATION of minimally invasive therapies and rationale for a prospective randomized trial to evaluate selective intra-arterial lysis for clinically complete central retinal artery occlusion." Archives of Ophthalmology **121**(10): 1377-1381.

NAPPER, G. A., M. J. PIANTA and M. KALLONIATIS (1999). "Reduced glutamate uptake by retinal glial cells under ischemic/hypoxic conditions." Visual neuroscience **16**(01): 149-158.

Naskar, R., M. Wissing and S. Thanos (2002). "Detection of Early Neuron Degeneration and Accompanying Microglial Responses in the Retina of a Rat Model of Glaucoma." Investigative Ophthalmology & Visual Science **43**(9): 2962-2968.

Newman, E. (1996). "Acid efflux from retinal glial cells generated by sodium bicarbonate cotransport." The Journal of Neuroscience **16**(1): 159-168.

Newman, E. and A. Reichenbach (1996). "The Müller cell: a functional element of the retina." Trends in Neurosciences **19**(8): 307-312.

Newman, E. A. and K. R. Zahs (1998). "Modulation of Neuronal Activity by Glial Cells in the Retina." The Journal of Neuroscience **18**(11): 4022-4028.

Okada, M., M. Matsumura, N. Ogino and Y. Honda (1990). "Müller cells in detached human retina express glial fibrillary acidic protein and vimentin." Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology **228**(5): 467-474.

Osborne, N. N., F. Block and K.-H. Sontag (1991). "Reduction of ocular blood flow results in glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in rat retinal Müller cells." Visual Neuroscience **7**(06): 637-639.

Osborne, N. N., R. J. Casson, J. P. M. Wood, G. Chidlow, M. Graham and J. Melena (2004). "Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies." Progress in Retinal and Eye Research **23**(1): 91-147.

Osborne, N. N., M. Ugarte, M. Chao, G. Chidlow, J. H. Bae, J. P. M. Wood and M. S. Nash (1999). "Neuroprotection in Relation to Retinal Ischemia and Relevance to Glaucoma." Survey of Ophthalmology **43**, **Supplement 1**: S102-S128.

Pannicke, T., I. Frommherz, B. Biedermann, L. Wagner, K. Sauer, E. Ulbricht, W. Härtig, U. Krügel, U. Ueberham, T. Arendt, P. Illes, A. Bringmann, A. Reichenbach and A. Grosche (2014). "Differential effects of P2Y(1) deletion on glial activation and survival of photoreceptors and amacrine cells in the ischemic mouse retina." Cell Death & Disease **5**(7): e1353.

Pannicke, T., O. Uckermann, I. Iandiev, B. Biedermann, P. Wiedemann, I. Perlman, A. Reichenbach and A. Bringmann (2005). "Altered membrane physiology in Müller glial cells after transient ischemia of the rat retina." Glia **50**(1): 1-11.

Paulson, O. B. and E. A. Newman (1987). "Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow?" Science (New York, NY) **237**(4817): 896.

Pielen, A., B. Junker, L. Hansen, H. Agostini and N. Feltgen (2010). "Diagnostik und Therapie beim nicht arteriitischen Zentralarterienverschluss." Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde **227**(09): 712-720.

Pierce, E. A., R. L. Avery, E. D. Foley, L. P. Aiello and L. E. Smith (1995). "Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization." Proceedings of the National Academy of Sciences **92**(3): 905-909.

Poitry-Yamate, C., S. Poitry and M. Tsacopoulos (1995). "Lactate released by Muller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina." The Journal of Neuroscience **15**(7): 5179-5191.

Prager, T. C., C. A. Garcia, C. A. Mincher, J. Mishra and H.-H. Chu (1990). "The Pattern Electroretinogram in Diabetes." American Journal of Ophthalmology **109**(3): 279-284.

Provis, J. M., C. M. Diaz and P. L. Penfold (1996). "Microglia in human retina: a heterogeneous population with distinct ontogenies." Perspectives on developmental neurobiology **3**(3): 213-222.

Pyrzynska, B., A. Lis, G. Mosieniak and B. Kaminska (2001). "Cyclosporin A-sensitive signaling pathway involving calcineurin regulates survival of reactive astrocytes." Neurochemistry International **38**(5): 409-415.

Rama Rao, K. V., M. Chen, J. M. Simard and M. D. Norenberg (2003). "Suppression of ammonia-induced astrocyte swelling by cyclosporin A." Journal of Neuroscience Research **74**(6): 891-897.

Rassam, S., V. Patel and E. Kohner (1993). "The effect of acetazolamide on the retinal circulation." EYE-LONDON-OPHTHALMOLOGICAL SOCIETY OF THE UNITED KINGDOM THEN ROYAL COLLEGE OF OPHTHALMOLOGISTS- 7: 697-697.

Reichenbach, A. and A. Bringmann (2013). "New functions of Müller cells." Glia 61(5): 651-678.

Rey-Funes, M., V. B. Dorfman, M. E. Ibarra, E. Peña, D. S. Contartese, J. Goldstein, J. M. Acosta, I. M. Larráyoz, R. Martínez-Murillo, A. Martínez and C. F. Loidl (2013). "Hypothermia Prevents Gliosis and Angiogenesis Development in an Experimental Model of Ischemic Proliferative RetinopathyHypothermia Prevents Retinal Gliosis and Angiogenesis." Investigative Ophthalmology & Visual Science 54(4): 2836-2846.

Rey-Funes, M., I. M. Larrayoz, J. C. Fernandez, D. S. Contartese, F. Rolon, P. I. Inserra, R. Martinez-Murillo, J. J. Lopez-Costa, V. B. Dorfman, A. Martinez and C. F. Loidl (2016). "Methylene blue prevents retinal damage in an experimental model of ischemic proliferative retinopathy." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 310(11): R1011-1019.

Rocha, M., R. A. P. Martins and R. Linden (1999). "Activation of NMDA receptors protects against glutamate neurotoxicity in the retina: evidence for the involvement of neurotrophins." Brain Research 827(1–2): 79-92.

Romano, C., Q. Chen and J. W. Olney (1998). "The intact isolated (ex vivo) retina as a model system for the study of excitotoxicity." Prog Retin Eye Res 17(4): 465-483.

Rumelt, S. and G. C. Brown (2003). "Update on treatment of retinal arterial occlusions." Current Opinion in Ophthalmology 14(3): 139-141.

Rumelt, S., Y. Dorenboim and U. Rehany (1999). "Aggressive systematic treatment for central retinal artery occlusion." American Journal of Ophthalmology 128(6): 733-738.

Rungger-Brändle, E., A. A. Dosso and P. M. Leuenberger (2000). "Glial Reactivity, an Early Feature of Diabetic Retinopathy." Investigative Ophthalmology & Visual Science 41(7): 1971-1980.

Salido, E. M., D. Dorfman, M. Bordone, M. Chianelli, M. F. González Fleitas and R. E. Rosenstein (2013). "Global and Ocular Hypothermic Preconditioning Protect the Rat Retina from Ischemic Damage." PLoS ONE 8(4): e61656.

Schmid, H., M. Renner, H. B. Dick and S. C. Joachim (2014). "Loss of inner retinal neurons after retinal ischemia in rats." Invest Ophthalmol Vis Sci 55(4): 2777-2787.

Schmidt, D., A. Hetzel, A. Geibel-Zehender and J. Schulte-Monting (2007). "Systemic diseases in non-inflammatory branch and central retinal artery occlusion-an overview of 416 patients." European journal of medical research **12**(12): 595.

Schnichels, S. (2010). "Occurrence and importance of the repulsive guidance molecule (RGM) in the optic nerve and retina of glaucoma and optic nerve crush animal models". Verlag Dr. Hut.

Schnichels, S., M. Blak, T. Dorfi, J. Hofmann, K.-U. Bartz-Schmidt, F. Ziemssen, M. Schultheiss and M. Spitzer (2013). "Establishment of a retinal ischemia organ culture model." Investigative Ophthalmology & Visual Science **54**(15): 6333-6333.

Schnitzer, J. (1988). "Immunocytochemical studies on the development of astrocytes, Müller (glial) cells, and oligodendrocytes in the rabbit retina." Developmental Brain Research **44**(1): 59-72.

Schuetz, E. and S. Thanos (2004). "Microglia-Targeted Pharmacotherapy in Retinal Neurodegenerative Diseases." Current Drug Targets **5**(7): 619-627.

Schumacher, M., D. Schmidt, B. Jurklies, C. Gall, I. Wanke, C. Schmoor, H. Maier-Lenz, L. Solymosi, H. Brueckmann, A. S. Neubauer, A. Wolf and N. Feltgen (2010). "Central Retinal Artery Occlusion: Local Intra-arterial Fibrinolysis versus Conservative Treatment, a Multicenter Randomized Trial." Ophthalmology **117**(7): 1367-1375.e1361.

Schütte, M. and P. Werner (1998). "Redistribution of glutathione in the ischemic rat retina." Neuroscience Letters **246**(1): 53-56.

Shiga, Y., H. Onodera, Y. Matsuo and K. Kogure (1992). "Cyclosporin A protects against ischemia-reperfusion injury in the brain." Brain Research **595**(1): 145-148.

Si, Q. S., Y. Nakamura and K. Kataoka (1997). "Hypothermic suppression of microglial activation in culture: inhibition of cell proliferation and production of nitric oxide and superoxide." Neuroscience **81**(1): 223-229.

Silver, I. A., J. Deas and M. Erecińska (1997). "Ion homeostasis in brain cells: differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells." Neuroscience **78**(2): 589-601.

Singh, S. and R. Dass (1960). "The central artery of the retina I. Origin and course." The British journal of ophthalmology **44**(4): 193.

Stefánsson, E., C. A. Wilson, T. Schoen and T. Kuwabara (1988). "Experimental ischemia induces cell mitosis in the adult rat retina." Investigative Ophthalmology & Visual Science **29**(7): 1050-1055.

Stollg, G. and S. Jander (1999). "The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS." Progress in Neurobiology **58**(3): 233-247.

Stone, J., A. Itin, T. Alon, J. Pe'er, H. Gnessin, T. Chan-Ling and E. Keshet (1995). "Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia." The Journal of Neuroscience **15**(7): 4738-4747.

Streit, W. J. (2000). "Microglial Response to Brain Injury: A Brief Synopsis." Toxicologic Pathology **28**(1): 28-30.

Streit, W. J., S. A. Walter and N. A. Pennell (1999). "Reactive microgliosis." Progress in Neurobiology **57**(6): 563-581.

Sucher, N. J., S. A. Lipton and E. B. Dreyer (1997). "Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells." Vision Research **37**(24): 3483-3493.

Tezel, G. and M. B. Wax (2000). "Increased Production of Tumor Necrosis Factor- α by Glial Cells Exposed to Simulated Ischemia or Elevated Hydrostatic Pressure Induces Apoptosis in Cocultured Retinal Ganglion Cells." The Journal of Neuroscience **20**(23): 8693-8700.

Tezel, G. I. n., B. C. Chauhan, R. P. LeBlanc and M. B. Wax (2003). "Immunohistochemical Assessment of the Glial Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in Glaucoma." Investigative Ophthalmology & Visual Science **44**(7): 3025-3033.

Thanos, S., S. Moore and Y.-m. Hong (1996). "Retinal microglia." Progress in Retinal and Eye Research **15**(2): 331-361.

Tout, S., T. Chan-Ling, H. Holländer and J. Stone (1993). "The role of müller cells in the formation of the blood-retinal barrier." Neuroscience **55**(1): 291-301.

Tura, A. I., F. Schuettauf, P. P. Monnier, K. U. Bartz-Schmidt and S. Henke-Fahle (2009). "Efficacy of Rho-kinase Inhibition in Promoting Cell Survival and Reducing Reactive Gliosis in the Rodent Retina." Investigative Ophthalmology & Visual Science **50**(1): 452-461.

Uhlmann, S., A. Bringmann, O. Uckermann, T. Pannicke, M. Weick, E. Ulbricht, I. Goczałik, A. Reichenbach, P. Wiedemann and M. Francke (2003). "Early Glial Cell Reactivity in Experimental Retinal Detachment: Effect of Suramin." Investigative Ophthalmology & Visual Science **44**(9): 4114-4122.

v. Graefe, A. (1859). "Über Embolie der Arteria centralis retinae als Ursache plötzlicher Erblindung." Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology **5**(1): 136-157.

Wakakura, M. and W. S. Foulds (1988). "Immunocytochemical characteristics of Müller cells cultured from adult rabbit retina." Investigative Ophthalmology & Visual Science **29**(6): 892-900.

Wang, G. J., H. Y. Deng, C. M. Maier, G. H. Sun and M. A. Yenari (2002). "Mild hypothermia reduces ICAM-1 expression, neutrophil infiltration and microglia/monocyte accumulation following experimental stroke." Neuroscience **114**(4): 1081-1090.

Wang, X., M. Niwa, A. Hara, H. Matsuno, K. Kawase, O. Kozawa, H. Mori and T. Uematsu (2002). "Neuronal degradation in mouse retina after a transient ischemia and protective effect of hypothermia." Neurological Research **24**(7): 730-735.

Wang, X., S.-W. S. Tay and Y.-K. Ng (2000). "An immunohistochemical study of neuronal and glial cell reactions in retinae of rats with experimental glaucoma." Experimental Brain Research **132**(4): 476-484.

Willbold, E., J. Berger, M. Reinicke and H. Wolburg (1997). "On the role of Muller glia cells in histogenesis: only retinal spheroids, but not tectal, telencephalic and cerebellar spheroids develop histotypical patterns." J Hirnforsch **38**(3): 383-396.

Wurm, A., I. Iandiev, S. Uhlmann, P. Wiedemann, A. Reichenbach, A. Bringmann and T. Pannicke (2011). "Effects of Ischemia-Reperfusion on Physiological Properties of Müller Glial Cells in the Porcine Retina." Investigative Ophthalmology & Visual Science **52**(6): 3360-3367.

Yenari, M. A. and T. M. Hemmen (2010). "Therapeutic Hypothermia for Brain Ischemia Where Have We Come and Where Do We Go?" Stroke **41**(10 suppl 1): S72-S74.

Yu, S.-W., H. Wang, M. F. Poitras, C. Coombs, W. J. Bowers, H. J. Federoff, G. G. Poirier, T. M. Dawson and V. L. Dawson (2002). "Mediation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1-Dependent Cell Death by Apoptosis-Inducing Factor." Science **297**(5579): 259-263.

ZENG, X.-X., Y.-K. NG and E.-A. LING (2000). "Neuronal and microglial response in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats." Visual Neuroscience **17**(03): 463-471.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Univ.-Augenklinik Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. M. Spitzer und Dr. S. Schnichels durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. M. Spitzer (Doktorvater) und Dr. S. Schnichels (Betreuer).

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. M. Blak und Dr. S. Schnichels von mir eigenständig durchgeführt.

Dr. S. Schnichels präparierte die Augen, Dr. M. Blak fertigte die Schnitte an und stellte sie mir zur Verfügung.

Das Macro „GFAP Analyse Version 1.3“ für die Auswertung der Bilder mit ImageJ wurde mir von der Ruhr-Universität Bochum zur Verfügung gestellt und von Simon Fröhlich weiter entwickelt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Dr. S. Schnichels durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Aichtal, den 04.02.2018

Marion Melchinger

8 Danksagung

Ich danke dem Klinikleiter der Univ.-Augenklinik Tübingen Prof. Dr. med. Karl-Ulrich Bartz-Schmidt und meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Martin Spitzer für die freundliche Überlassung des Themas. Außerdem gilt mein besonderer Dank Dr. Sven Schnichels für die zuverlässige Betreuung während der letzten Jahre, für die kompetente fachliche Unterstützung und seine Hilfe bei der statistischen Auswertung. Ich danke Matthias Blak für die Überlassung seiner Schnitte und die Einweisung in die Färbemethoden. Dem ganzen Forschungsteam aus dem Breuningerbau, das mir bei Fragen hilfreich zur Seite stand.

Ich danke meinen Eltern, ohne die mein Studium und somit diese Arbeit nicht möglich gewesen wären. Liebe Mama, lieber Papa, danke für eure ständige Unterstützung und dass ihr mir immer alles ermöglicht habt.

Dir, lieber Simon, gilt mein besonderer Dank. Du warst in schwierigen Phasen der Entstehung dieser Arbeit für mich da und hast mich mit deinem unzerstörbaren Optimismus immer wieder motiviert.

Ich danke Anne und Steffen für die gemeinsamen Wochen in der Bib. Ohne euch wäre es nicht vorwärts gegangen.